

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA MICROBIOLOGIE DU SOL

(SIXIÈME MÉMOIRE)

SUR LA SYNTHÈSE DE L'AMMONIAQUE PAR LES AZOTOBACTERS DU SOL,

par S. WINOGRADSKY.

Dans une communication à l'Académie des Sciences, séance du 19 mars 1930 (t. 190, p. 661), nous avons établi le fait de l'hydrogénation de l'azote moléculaire par les *Azotobacters* du sol, réaction qui doit être considérée comme étant à la base même du phénomène de la fixation de ce gaz.

Dans le présent mémoire, nous nous proposons de décrire avec quelques détails les expériences qui conduisent à cette conclusion. Mais pour lui donner plus de relief, il paraît utile d'analyser brièvement les idées qui ont prévalu sur l'activité des *Azotobacters* durant la période déjà bien longue qui s'est écoulée depuis la découverte de ces agents bactériens si intéressants.

Un coup d'œil général nous suffira, l'historique du sujet et l'analyse de la littérature qui s'y rapporte ayant été déjà tant

de fois exposés dans les mémoires et monographies, ainsi que dans des traités de Microbiologie agricole (1).

D'abord, on est obligé de reconnaître que ce groupe a été étudié avec un maximum de soins, du point de vue de la Microbiologie générale, bien entendu, en culture pure. On s'est attaché à décrire avec le plus de détails sa morphologie et sa cytologie, ainsi que son métabolisme, tel qu'il s'effectue aux dépens de toutes sortes de substances énergétiques. Quant à ces dernières, on pourrait dire que l'on n'en a épargné aucune qui fût susceptible de lui servir d'aliment; le résultat fut que ce groupe s'est montré capable de brûler un nombre considérable de corps chimiques appartenant aux groupes des saccharides et polysaccharides, des acides mono- bi- et tribasiques, des alcools supérieurs et inférieurs, etc.; que cette combustion paraît complète, car on ne constate dans le milieu aucun produit de décomposition, ni acide, ni alcool. L'échange gazeux se borne à l'absorption de l'oxygène et au dégagement de l'acide carbonique.

Ces expériences ont été en partie conduites en présence d'une source abondante d'azote combiné, de nitrates pour la plupart, ce qui exclut toute action fixatrice. Parmi les plus récentes, les recherches étendues de Stapp (*loc. cit.*) en offrent un exemple; la fonction intéressante y était donc mise d'avance hors de considération.

Dans leur majorité cependant, les expériences s'efforçaient d'établir le rôle de la substance énergétique par rapport au processus de fixation. En résumé, celui-ci a été constaté dans tous les cas où le microbe se montrait capable d'attaquer le corps énergétique dans un milieu privé d'azote combiné; mais les efforts pour établir un rapport quantitatif entre les corps employés et le produit de la fixation n'ont jamais abouti. On n'est pas même parvenu à trouver une unité de comparaison valable pour tous les cas. Les rapports variaient également dans des limites relativement larges pour une seule et même subs-

(1) OMÉLIANSKY, Fixation de l'azote atmosphérique par les microbes du sol. Monographie 172 p. Pétersbourg, 1923; STAPP et RUSCHMANN. *Zur Biologie von Azotobacter*, Arbeiten der biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, 13, 1924, p. 305-368; STAPP, Die Stickstoffbindung durch Bakterien. C. R. du 1^{er} Congrès de la Science du Sol, 1927; WAKSMAN. *Principles of Soil Microbiology*, 1927, p. 572-575.

tance, ce qui dépendait évidemment des conditions variables des expériences, ou bien des caractères des souches du microbe dont on se servait.

Remarquons pourtant, en passant, que l'on obtient en opérant avec des milieux à base de silico-gel et avec une seule et même substance, telle que la mannite, un rapport sensiblement constant entre la substance énergétique dépensée et l'azote fixé, lequel se rapproche toujours de 1 p. 100 (Winogradsky).

Malgré la nature « omnivore », selon l'expression d'Oméliansky, de ces organismes, le choix du milieu-standard pour leur culture s'est fixé de bonne heure. La mannite et le glucose provoquant les pullulations les plus rapides et les plus abondantes avec le gain d'azote le plus élevé, ce fut la raison pour laquelle ces substances furent universellement adoptées pour la culture de ce groupe. Au cours des années de recherches, la mannite est surtout devenue l'ingrédient classique des formules pour la culture des *Azotobacters*, de sorte que leur activité dans la nature a paru finalement liée à la présence de ce corps, ou généralement des glucides, dans le milieu, presque au même titre que dans le cas des levures.

Ce choix a peut-être facilité la recherche de ces microbes dans les milieux naturels; il a permis d'avoir des cultures extra-abondantes, mais il a plutôt nui à la compréhension de leur rôle dans le sol. En effet, si dans les recherches pathologiques et sur les fermentations, ainsi que dans les industries qui en dépendent, l'abondance des cultures a une importance majeure, ce n'est plus le cas quand il s'agit de la fonction d'une espèce microbienne au sein de la nature; tout au contraire, dans ce cas, il est indispensable d'éviter de suralimenter, d'*hypertrophier* l'espèce dans un sens ou dans un autre, au moyen d'un régime tout différent de celui qu'elle trouve dans le sol.

Pour déchiffrer le problème du rôle des *Azotobacters* dans le sol, il aurait été donc plus logique d'éviter justement les glucides, lesquelles sont trop rares dans le sol, sans jamais être disponibles pour ces microbes, et de diriger les expériences principalement sur des substances dont la production fréquente dans le sol, ainsi que leur disponibilité pour les *Azotobacters*, ne présente aucun doute. Nous entendons principalement les acides et alcools de la série grasse à deux jusqu'à quatre atomes

de carbone : acides acétique, butyrique, ainsi que les acides lactique et succinique, les alcools éthyliques et butyliques, toutes ces substances étant les produits banaux des fermentations des matières hydrocarbonées. La question a été déjà discutée dans notre cinquième mémoire, et nous n'y reviendrons pas.

La capacité des microbes en question de pulluler assez abondamment aux dépens de ces substances, inférieures comme source d'énergie aux glucides, ne présente rien de nouveau ; particulièrement les acides gras comme source d'énergie pour les *Azotobacters* ont fait l'objet d'une étude détaillée de Gainey (1) avec le résultat que les *Azotobacters* sont capables d'utiliser les acides acétique, propionique, butyrique normal, caproïque, comme source d'énergie en fixant l'azote. Les alcools éthylique et butylique ont été également éprouvés sous ce rapport avec un résultat positif pour le premier des deux. Mais ces observations n'ont pas attiré toute l'attention qu'elles méritent au point de vue de la compréhension du rôle des *Azotobacters* dans la nature. On les a simplement enregistrées comme complétant la liste déjà longue des sources d'énergie dont les *Azotobacters* sont capables de profiter en culture pure, sans leur réserver une place prépondérante dans l'étude de ce rôle, l'usage de la mannite étant toujours considéré avec quelque raison comme plus avantageux, autant qu'il s'agit de cultures de laboratoire. Il en est résulté que, par le choix même du milieu, on se mettait dans des conditions tout artificielles : « l'esprit agrobiologique », si l'on peut dire ainsi, manquait encore à notre branche.

Ce défaut s'accuse encore avec plus de netteté, si l'on songe que la pureté des cultures était une règle avec laquelle on ne transigeait point. En s'y tenant le plus strictement possible, on se servait le plus volontiers de cultures de collection, dont la vie au laboratoire aux dépens des glucides s'étendait déjà sur de longues années. Certes, on en isolait aussi fraîchement du sol, ce qui impliquait, tout de même, une série d'opérations comportant un temps de culture dans le milieu liquide d'enrichissement, suivi d'une série de repiquages sur gélose mannitée :

(1) Sources of energy for *Azotobacter* with special reference to fatty acids. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 15, 1928, p. 113-168.

l'espèce avait pareillement tout le temps de se modifier, si elle en avait la disposition. Sans qu'une étude suivie sur l'aptitude de ces organismes à modifier leurs fonctions sous l'influence des conditions de culture soit jamais faite, on a noté pourtant de divers côtés des symptômes de dégénérescence par rapport au pouvoir fixateur. Quoi qu'il en soit, il est évident qu'au point de vue agrobiologique toute culture pure de laboratoire, même assez récente, sans parler des anciennes, est suspecte quand il s'agit de démêler les rouages intimes d'une fonction que le microbe exerce au sein du sol et qui peut être fragile, ou bien liée à des conditions d'existence bien déterminées et non reproduites par la culture artificielle.

Passant au processus même de fixation, les recherches n'ont porté presque exclusivement que sur son produit définitif : l'azote protéique. Restait à élucider, d'un côté les débuts du processus entier, c'est-à-dire, la réaction chimique qui conduit à la fixation ; d'un autre, ses suites, soit le sort de l'azote fixé par les cellules et son importance économique en tant que source d'azote combiné, capable d'en maintenir la réserve dans le sol.

La première question n'a provoqué, pendant de longues années, que des hypothèses qui reflétaient deux tendances principales, dont l'une y voyait une oxydation de l'azote moléculaire, l'autre son hydrogénation. La première n'apportait aucun fait, car on ne constatait jamais dans les cultures de formation de nitrites ou nitrates, si facilement décelables. La seconde avait la théorie pour elle, ainsi que le fait d'une réduction énergétique exercée par ces microbes sur les nitrates. Mais, dans aucun travail, sauf un seul, dont il sera question tout à l'heure, on ne trouve d'indications sur la présence de l'ammoniaque dans les cultures, soit jeunes, soit âgées ; non seulement cette présence ne s'est pas imposée pendant les expériences vraiment innombrables de tant d'observateurs, mais les recherches spéciales dans cette direction n'ont pas abouti à la découvrir. En somme, le problème restait encore énigmatique à l'époque de la publication de la monographie d'Oméliansky (1923), lequel concluait alors « que le processus est enveloppé d'un profond mystère » (*loc. cit.*, p. 105). En 1927, Stapp, ayant posé de son côté la question du chimisme de la fixation (*Che-*

mismus der Stickstoffbindung), n'y trouve qu'une réponse aussi courte que décourageante : *ignoramus* (*loc. cit.*, p. 10).

Le travail qui occupe une place à part dans le problème, appartient au phyto-physiologiste russe, le regretté Kostytchew (1), si prématurément décédé il y a quelques mois. C'est le seul travail, à notre connaissance, qui prend position en théorie en apportant en même temps un groupe de faits à l'appui. Partis de l'idée que la fixation de l'azote est un phénomène de réduction, analogue à l'assimilation des nitrates par les moisissures (où l'on remarque une réduction de l'azote nitrique jusqu'à l'état d'azote ammoniacal), seulement avec un potentiel de réduction plus considérable, les auteurs ont institué nombre d'expériences en se servant d'une souche d'*Azotobacters* mise à leur disposition par un collègue et étiquetée *Azotobacter agile*, culture pure. Quant aux origines de cette souche et à ses caractères, on ne trouve aucune indication, sauf qu'elle provenait d'une terre de Pétrograd.

En opérant toujours avec des cultures jeunes, plus actives, les auteurs ont commencé par rechercher la présence d'azote combiné soluble dans le liquide au bout d'une dizaine ou d'une quinzaine de jours : le résultat a été positif dans les sept expériences mentionnées, et l'analyse de cet azote soluble a montré qu'il était composé, partie d'azote ammoniacal, partie d'azote aminé, la somme des deux dosages étant sensiblement égale à la quantité totale d'azote soluble déterminée par l'analyse. Il s'agissait de quantités notables et même importantes dans le cas, toujours en solution dans le liquide débarrassé des cellules par centrifugation, par exemple :

Culture de dix jours dans 300 cent. cubes de liquide : azote en solution 10 milligr. 7, dont azote ammoniacal 4 milligr. 9, azote aminé 6 milligr. 5.

Culture de six jours dans 400 cent. cubes de solution sucrée : azote en solution, 13 milligr. 4, dont azote ammoniacal, 12 milligr. 4.

Culture de quinze jours dans 400 cent. cubes de solution sucrée : azote soluble 9 milligr. 7, dont azote ammoniacal 5 milligr. 2, azote aminé 4 milligr. 7. Et ainsi de suite.

(1) KOSTYTCHEW et RYSKALTCHOUK, Les produits de la fixation de l'azote atmosphérique par l'*Azotobacter agile*. *C. R. Acad. Sc.*, **180**, 1925, p. 2070. Les mêmes et SCHWEZOWA, Biochemische Untersuchungen über *Azotobacter agile*. *Z. f. Physiol. Chem.*, **154**, 1926.

Ces résultats démontreraient que ce rendement en azote ammoniacal et aminé représente réellement les phases primaires de la synthèse, car on l'obtient dans des conditions où une production secondaire ne serait pas possible; de plus, la dégradation des protides serait accompagnée de divers autres produits qui manquent dans ce cas, la somme de l'azote ammoniacal et aminé composant, comme il a été dit, la quantité totale de l'azote soluble.

La fixation, concluent les auteurs, se fait donc, en principe, par le même phénomène de synthèse que dans le procédé chimique de Haber, et le fait que cette synthèse ayant lieu dans un mélange d'azote et d'hydrogène ne se produit qu'à des pressions de plusieurs centaines d'atmosphères et à des températures de plusieurs centaines de degrés en présence de catalyseurs métalliques, tels que osmium, urane, manganèse, etc., tandis que la synthèse biologique se produit à des températures et à des pressions ordinaires, ne saurait surprendre le biologiste, qui connaît la puissance d'action des catalyseurs organiques.

Ces résultats que l'on trouve déjà mentionnés dans le *Traité de Physiologie des Plantes* de Kostytchew, paru en 1924, n'ont pas encore trouvé confirmation ni critique. On se contente simplement de les mentionner, et cet accueil réservé est facile à comprendre, car ils s'accordent mal avec un nombre immense d'expériences antérieures et postérieures, où aucune production d'ammoniaque n'avait pas été constatée. La divergence reste inexplicable, les auteurs n'ayant mis en œuvre aucun nouveau procédé de culture comportant quelque moyen de modifier la marche du processus ou de bloquer son produit primaire: les expériences, comme il a été dit, ont été exécutées simplement dans le milieu liquide standard avec de la mannite ou du glucose comme aliment. Il est donc difficile d'accepter les données avancées comme normales, ou courantes. Bien plus, l'impression s'en dégage d'une anomalie, d'un déséquilibre pathologique, car il est impossible d'admettre que ce produit primaire, si précieux dans ce cas, subisse le sort d'un produit de désassimilation rejeté par la cellule comme excretum, et cela en quantités si notables, en y ajoutant encore de l'azote aminé, qui est le produit de la première étape dans la voie de l'édification des protides! L'objection, que cet azote combiné

déverse dans le milieu ne serait pas perdu, les pullulations étant en état de le reprendre, ne pourrait être valable évidemment que pour le cas tout artificiel d'une culture pure. Dans la nature, cet azote deviendrait immédiatement la proie de non-fixateurs, lesquels envahiraient le milieu en s'emparant encore de toute la substance énergétique disponible au détriment des fixateurs, car ces derniers ont toujours le dessous en présence d'une dose même faible d'aliment azoté. Ces relations ayant été exposées en détail ailleurs (voir cinquième mémoire), il est inutile d'y revenir.

En résumé, les données expérimentales de ce mémoire paraissent impossibles à généraliser. Nous en tenterons une explication à la suite de nos propres expériences. En attendant, on se demandera si la présence de tant d'ammoniaque ne pourrait être attribuée à la méthode de dosage qui était employée : distillation sous pression réduite et à 35°, mais en présence de CaO. L'ammoniaque supposée libre, il aurait été plus sûr de la doser sans chaux vive. Le risque de provoquer quelque processus régressif n'en devient que plus sérieux et l'interprétation plus incertaine.

Restent à examiner les opinions sur ce que nous avons appelé les suites du processus de fixation, autrement dit, le sort de l'azote assimilé et son utilisation. Sur ce point on peut être bref. Si la question touchant au produit primaire a suscité tant de théories et de controverses, tout en restant énigmatique, celle qui nous intéresse a paru d'emblée claire : tout le monde a été d'accord pour voir dans l'azote assimilé par les cellules, et ayant pris la forme de matière protéique, la seule contribution que les fixateurs apportent au régime azoté du sol. On a donc beaucoup étudié cette matière, laquelle, d'après les analyses d'Oméliansky et Sieber, ne dépasse pas environ 13 p. 100 de la matière sèche des cellules, ce qui correspond à 2 p. 100 d'azote organique. Naturellement, la question se posait de savoir si cet azote, issu directement du réservoir de l'atmosphère, passe bientôt en solution, devenant disponible pour les plantes ou pour les pullulations de non-fixateurs. Eh bien, des expériences faites *ad hoc* ont montré que les cellules azotobactériennes sont très résistantes à la décomposition. Particulièrement démonstratives sur ce point sont les observations

de Moler (1) : cet observateur n'a trouvé, contrairement à Kostytchew, aucune forme de substance azotée soluble dans les cultures en solution, ni durant le premier mois de culture, ni au bout de six mois et demi de conservation : après filtration, l'azote total se retrouvait, c'est-à-dire dans la partie insoluble, dans les cellules.

Remarquons que le seul aspect microscopique des cellules âgées, déjà brunies, donc passées à l'état de repos, est de nature à inspirer confiance dans leur résistance : arrondies, entourées d'une membrane épaisse, elles présentent de véritables petits kystes que l'on se figure plutôt inattaquables par les microbes du sol ou par les intempéries. On sait, par exemple, qu'un état de sécheresse prolongé jusqu'à dix ans ne vient pas à bout de leur vitalité (Oméliansky). La seule conclusion possible de ces observations est que, si les fixateurs contribuent indubitablement à augmenter le capital du sol en azote combiné, ce surplus ne passe que très difficilement et très lentement en circulation. Un effet immédiat de l'activité des fixateurs serait donc hors de cause, et seul un effet plus ou moins lointain serait à envisager. C'est encore un argument pour ceux qui se montrent sceptiques en ce qui concerne l'importance pratique de la fixation biologique (2).

(1) MOLER. *Botaniska Notiser*, 1915, p. 163-177. Cité d'après Bonazzi.

(2) L'un des plus sceptiques est le microbiologiste américain Aug. Bonazzi. On lui doit des études intéressantes sur la morphologie et la physiologie du groupe, que l'on trouve résumées dans sa communication au Congrès de la Société internationale de la Science du sol à Rome en 1925 (Voir : *The mineralisation of atmospheric nitrogen by biological means*, Proceedings of the IV Inter. Soil Congress). Comme corollaire de ses recherches, le véritable rôle du groupe *Azotobacter* lui apparaît comme celui d'un balayeur ou ramasseur de l'azote nitrique dans le sol (*soil scavenger*), capable, il est vrai, de fixer l'azote gazeux, mais seulement quand il y est forcé par l'inanition azotée, ce qui ne doit pas arriver dans le sol et ne pourrait ainsi avoir quelque importance pour l'agriculture.

La conclusion est à retenir, comme exemple instructif des erreurs auxquelles peut conduire la méthode courante, quand il s'agit de déchiffrer le rôle d'un agent microbien dans la nature. La conclusion est le résultat direct d'expériences exclusives en culture pure, où une dose de nitrate paraît favoriser beaucoup le développement du microbe qui n'a alors guère besoin de l'azote gazeux. Or, quelques expériences en présence de la flore microbienne entière du sol auraient montré à l'auteur que ce même azote nitrique met alors ce même *Azotobacter* à l'état d'infériorité telle, qu'il ne parvient pas à pulluler du tout, tandis que le manque d'azote combiné le rend maître du milieu. C'est donc dans la compétition pour la matière éner-

DÉBUT DES RECHERCHES ET MÉTHODES.

Tel était en grandes lignes l'état du problème quand nous avons été poussé à l'aborder par une observation assez inattendue dont il sera question tout à l'heure.

Ce n'est pas, en tout cas, le travail de Kostytchew et collaborateurs qui fut notre point de départ. Non seulement leur méthode ne convenait pas aux principes de celle que nous avons eu l'occasion d'exposer plusieurs fois, mais il apportait des faits que nous n'avons jamais observés dans nos nombreuses cultures des *Azotobacters*. Rappelons qu'elles ont été faites sur des plaques de silico-gel imprégnées de mannite et ensemencées avec une dose déterminée de terre en nature. Les expériences n'avaient pour but que de mettre au point une méthode de détermination de la densité des germes *Azotobacters* dans les échantillons du sol, ce qui justifiait l'emploi d'une substance énergétique capable de provoquer les pullulations les plus abondantes. Un nombre considérable de plaques nous a passé sous les yeux et a été soumis à un examen soigné et à l'analyse; les pullulations y étaient très abondantes, une couche de mucus épaisse couvrait toute la surface du gel; si donc le dégagement de l'ammoniaque est un fait régulier et s'il est plus marqué, comme l'indique le travail en question, dans les cultures jeunes, cette ammoniaque devait apparaître à plus forte raison dans les conditions de nos cultures plus favorables, où les germes provenaient tout frais du sol, où les masses microbiennes étaient en contact immédiat avec l'air et non noyées dans un volume considérable de liquide. Le déceler n'aurait pas même nécessité aucune épreuve spéciale, car, à des doses relativement si importantes, il devait s'imposer simplement à l'odorat. Or, durant les deux années d'études sur le pouvoir fixateur des terres, on n'a jamais noté aucune observation qui puisse confirmer les faits avancés. Il paraissait donc établi que les pullulations luxuriantes qui ont lieu aux dépens de la mannite ne dégagent pas d'ammoniaque de synthèse, se-

gétique que l'on trouve le rouage qui détermine la fonction naturelle dans ce cas et dans bien d'autres. Inutile de dire qu'il échappe à ceux qui limitent leurs observations aux cultures pures.

rait-on même tout disposé à l'admettre comme produit primaire.

Il est évident que ce fait négatif ne contredit aucunement l'hypothèse, car elle n'implique nullement un dégagement d'ammoniaque dans le milieu. Tout au contraire, il paraît plus logique de penser que cette ammoniaque est utilisée au fur et à mesure de sa formation par les cellules jeunes et en pleine croissance, et d'autant plus complètement que les pullulations sont plus actives. N'est-il pas infiniment plus probable d'admettre que ce sont plutôt les cellules vieillissantes, à métabolisme ralenti ou entravé par quelque influence, qui laisseraient échapper ce produit primaire, sans pouvoir l'utiliser à la synthèse de leur protéine?

Sans même rechercher spécialement ces influences, nous sommes bientôt tombé sur un cas de ce genre, à l'occasion des recherches sur les pullulations provoquées par diverses substances chimiques (Voir 5^e Mémoire. Sur l'analyse microbiologique du sol, Ces *Annales*, numéro de janvier). Ce n'était pas cette fois la mannite qui servait à provoquer les pullulations des *Azotobacters* du sol, mais les acides organiques sous forme de sels de soude.

Le 3 février 1930, on prépare une plaque de silico-gel que l'on imprègne avec le mélange suivant :

Lactate de soude, en gramme.	0,3
Solution de sels minéraux, en centimètres cubes	2
Carbonate de calcium, en gramme	0,3
Potasse en solution 2 p. 100, q. s. pour $pH = 6,9$.	
Eau distillée, q. s.	

Ensemencement avec 0 gr. 2 de terre *Esp.*

Le 5 février, la plaque est couverte de colonies *Azotobacters*. Elle dégage une odeur très nette d'ammoniaque ; un petit carré de papier tournesol rose fixé au couvercle de la boîte bleuit rapidement.

L'interprétation de cette observation, assez inattendue, ne présentait d'emblée aucun doute : il était clair que cette ammoniaque ne pouvait être que de l'ammoniaque synthétique, car le milieu ne contenait de l'azote combiné sous aucune forme : que cette ammoniaque devait être le produit de l'activité fixatrice des *Azotobacters*, car il n'y avait aucune autre pullulation sur la plaque : enfin, que le dégagement était dû, dans ce cas, à la

réaction alcaline du milieu, effet de la destruction des ions acides du lactate de soude par la végétation des microbes. L'idée que c'est l'alcali fixe qui bloque l'alcali volatil en prévenant son assimilation et en le chassant du milieu paraîtra toute naturelle. En effet, l'épreuve au moyen de la méthode simplifiée indiquée dans notre 5^e Mémoire a montré qu'un petit grumeau du gel, libre de colonies, jeté dans quelques gouttes de thymol-sulfone-phthaléine, y produit une tache bleu-indigo, ce qui indique un pH non inférieur à 8,8-9,0. La concentration des ions H^+ est donc montée de $pH = 6,9$ jusqu'à $pH = 9,0$ en quarante-huit heures, et cet accroissement rapide a évidemment déséquilibré le processus assimilatoire des cellules, qui ont laissé échapper le produit primaire dans l'ambiance.

Pour contrôler l'interprétation, on remplace le lactate par du succinate de soude.

On prépare une plaque en tout pareille à la précédente sauf que l'on donne 0 gr. 3 de succinate de soude au lieu du lactate; le $pH = 7,0$; ensemencement avec 0 gr. 2 de terre *Esp.* Au bout de quarante-huit heures odeur légèrement mais nettement ammoniacale; le virage du tournesol et autres épreuves, dont il sera question dans la suite, démontrent un dégagement d'ammoniaque dans l'air et sa présence dans le gel.

Un cas bien déterminé était donc devant nous, où ce produit primaire, resté si longtemps plutôt hypothétique, était facile à capter. Un autre nous était connu antérieurement: celui des cultures sur mannite, où ce produit échappait totalement à l'observation. Par conséquent, il paraissait logique de conclure qu'il ne s'agit guère d'un produit normal, en quelque sorte obligatoire, mais que sa présence dépend entièrement des conditions de la végétation, spécialement de la substance énergétique offerte. Il importait donc d'en étudier de plus près quelques-unes, choisies comme types, sous le rapport qui nous intéresse. Pour remplir ce programme, nous avons exécuté un certain nombre d'expériences qui seront exposées dans la suite, en les groupant d'après la nature des aliments employés.

Quant à la méthode, on se servait tantôt de petites boîtes de Pétri de 10 centimètres de diamètre, tantôt de grandes boîtes de 20 centimètres, chargées de silico-gel imprégné selon l'une ou l'autre des formules. Dans quelques expériences, des plaques de gélose ont été employées. Pour ensemencer, le plus souvent

on répandait des particules de terre d'un échantillon riche en germes *Azotobacters*, ce qui est le meilleur mode d'ensemencement, d'après les idées exposées au début de ce mémoire. En effet, l'exigence de la culture pure n'aurait aucune raison dans ce cas; on la comprendrait mieux, s'il s'agissait de départager l'activité des *Azotobacters* de celle d'un autre groupe de fixateurs. Mais dans notre cas, il était bien facile de s'assurer que ce ne sont que ces formes prises en bloc qui pullulent sur nos milieux électifs. Certes, il n'est pas impossible que l'on se mette dans l'avenir à différencier les souches du groupe sous ce rapport, mais en attendant on en est encore bien loin.

Nous n'avons pourtant pas manqué de nous servir également de suspensions de colonies pures pour l'ensemencement : ceci pour voir s'il n'y avait pas quelque différence d'effet, ainsi que pour éliminer les particules de terre. On réussit le plus rapidement et le plus directement à tirer du sol des végétations pures en se servant d'une plaque s. g. à benzoate de soude selon la formule :

Benzoate de soude, en gramme	0,1
Solution de sels, en centimètres cubes	2
CaCO ₃ , en gramme	0,1
Potasse 2 p. 100, III gouttes ou q. s. pour pH = 7,0.	

On enseme en répandant, — le mieux au moyen d'un creuset Gooch, — environ 1 à 2 centigrammes d'un échantillon de terre assez riche en *Azotobacters* donnant au moins 2.000 colonies par gramme. Au bout de deux jours et demi, à 30°-32°, les colonies caractéristiques, entourées déjà d'un halo noirâtre dans le gel, auront atteint de plusieurs millimètres à 1 centimètre de diamètre. En faisant l'examen microscopique de l'une ou l'autre, on constatera le plus souvent que le tableau microscopique ne présente absolument aucune forme étrangère aux *Azotobacters*. La grande forme y domine souvent. En piquant plusieurs fois la colonie choisie on en fait une suspension dans 10 cent. cubes d'eau de robinet stérilisée, que l'on distribue à raison de 2 cent. cubes par grande plaque et de 0,25 par petite, de manière à mouiller toute la surface. Au bout de vingt-quatre heures, elle se présente entièrement envahie par une couche muqueuse composée de pullulations pures d'*Azotobacters*.

On peut se servir également pour le même but d'une plaque à l'alcool éthylique, selon la formule que l'on trouvera dans la suite. La végétation y est plus rapide, les colonies devenant grandes au bout d'une quarantaine d'heures; mais on y trouve à l'examen soigneux quelques rares groupes d'un petit bâtonnet, disposés en groupes radiaires (*Radiobacter*?), qui ne gênent pas pourtant les expériences, car ses pullulations restent insignifiantes.

Les épreuves chimiques, quand il s'agit de déceler et de doser l'ammoniaque, sont, comme on le sait, extrêmement sensibles : la nesslerisation permettant de déterminer avec sûreté des quantités de l'ordre de millièmes de milligramme d'azote ammoniacal. Pour rendre le dosage plus rapide, on se sert d'une échelle colorimétrique toute prête dans des tubes marqués à 50 cent. cubes et bouchés à l'émeri (dits tubes de Granval-Lajoux) présentant la gamme usuelle qui correspond aux taux suivants d'azote ammoniacal en centièmes de milligramme :

0 0,1 0,3 0,5 0,7 1,0 1,5 2,0 2,5 3,0 4,0 5,0 6,0

Tous les dosages par nesslerisation seront notés dans la suite en centièmes de milligramme d'azote ammoniacal.

S'il s'agit de quantités plus importantes, on jette le gel dans un ballon, on triture avec de l'eau exempte d'ammoniaque, on distille dans de l'acide N/10 que l'on titre avec de la baryte, environ N/30, ou que l'on nesslerise. Pour enlever plus complètement l'ammoniaque, on ventile le ballon de distillation au moyen d'un courant d'air ayant passé dans une éprouvette chargée de ponce sulfurique et un flacon-laveur avec de l'acide sulfurique étendu. Mais à moins de prolonger la distillation pendant plusieurs heures, il n'est pas possible d'enlever quantitativement l'ammoniaque dissoute sans recourir aux alcalis fixes.

Pour capter sans perte l'ammoniaque dégagée par les cultures, il aurait fallu conduire les cultures dans des fioles fermées reliées à des appareils d'épuration de l'air et à des flacons-laveurs, ce qui aurait singulièrement compliqué les expériences et, par conséquent, en aurait réduit le nombre. Or, comme on le verra, les quantités d'azote ammoniacal varient dans de trop larges limites, non seulement dans des conditions différentes, mais

dans des conditions semblables, pour que l'on puisse établir des rapports quantitatifs. Il apparaît donc plus logique de multiplier autant que possible les épreuves qualitatives dans le but de recueillir le plus grand nombre d'observations sur le fait même du dégagement de l'ammoniaque, assez souvent négatif, le moment de son apparition, sa durée, son rythme. Pour en indiquer le début, il est bon de coller un petit carré de papier tournesol rose, au moyen d'une gouttelette de gélose fondue, sur la face intérieure du couvercle de la boîte de culture. Pour en suivre l'exhalation et pour la doser d'une manière approximative, la nesslerisation de la rosée qui se condense sur cette face intérieure est le moyen le plus simple et le plus sûr. On provoque cette condensation à volonté, si elle manque, en posant sur la boîte, tenue à l'étuve à 35°, une grande fiole conique à fond plat de 20 centimètres de diamètre remplie d'eau froide, très commode pour servir de réfrigérant dans ce cas. Au bout d'un quart d'heure, on enlève les gouttelettes couvrant toute la surface intérieure du couvercle au moyen d'un peu d'eau exempte d'ammoniaque, on verse dans le tube de nesslerisation, on rince deux ou trois fois, on remplit jusqu'à la marque et on ajoute finalement goutte à goutte 2 cent. cubes de réactif de Nessler. Au bout d'un quart d'heure, un coup d'œil suffit pour trouver la place de la teinte obtenue dans l'échelle colorimétrique.

La méthode, tout en étant des plus simples et rapides, est assez sensible, et, ce qui est le plus important, elle permet de suivre le dégagement de l'ammoniaque pendant un délai indéfini, sans rien déranger. Le taux d'ammoniaque étant très faible et les boîtes munies de couvercles bien débordants, tenues bien fermées, les pertes sont négligeables. En effet, si l'on tient plusieurs boîtes l'une près de l'autre, ou bien superposées, on peut observer dans l'une constamment une réaction positive, tandis qu'elle reste négative dans ses voisines, ce qui démontre que de faibles quantités d'ammoniaque ne peuvent s'échapper d'une boîte pour passer dans une autre, ou se répandre dans l'air de l'étuve, du moins à un degré sensible à la réaction de Nessler.

Si on n'a pas l'intention de suivre la marche du dégagement, mais seulement de s'assurer qu'il a lieu effectivement en quantités dosables, on introduit dans la boîte de 20 centimètres, en la tenant renversée, couvercle en bas, une petite soucoupe plate,

chargée d'acide sulfurique N/1 ; au bout d'une huitaine de jours, on vide l'acide dans un ballon, on ajoute de la soude et on distille en recueillant dans de l'acide N/10 que l'on titre avec de la baryte environ N/30.

Pour déceler l'ammoniaque dans le gel à chaque moment sans déranger la culture, il suffit d'en découper un petit grumeau, gros comme un grain de blé, libre de colonies, et de le jeter dans une goutte de réactif de Nessler. A des doses très faibles, moins d'un milligramme d'azote ammoniacal par grande plaque, les grumeaux prennent au bout de quelques minutes une teinte jaune, à des doses supérieures une teinte rouille, ce qui est déjà un signe que la plaque donnera plusieurs milligrammes d'azote ammoniacal à la distillation.

LES EXPÉRIENCES.

Après les expériences du début, déjà mentionnées, un assez grand nombre ont suivi, dont nous allons décrire quelques-unes.

Les liquides d'imprégnation étaient toujours composés de la solution de sels minéraux additionnée d'une petite dose de carbonate de calcium et de la dose de substance organique. La solution saline contenait en grammes :

Phosphate monopotassique	1,0
Sulfate de magnésie	0,3
Chlorure de soude	0,3
Sulfate de fer	0,02
Sulfate de manganèse	0,02
Eau distillée	200

On en prenait 2 cent. cubes pour une petite plaque, 10 cent. cubes pour une grande. Le *pH* était réglé à 6,8 jusqu'à 7,0.

PLAQUES AU LACTATE ET AU SUCCINATE DE SOUDE. — Les deux sels peuvent être employés indifféremment avec le même résultat. Bien cristallisé, le dernier est plus commode à l'usage que le premier, qui est d'une consistance sirupeuse.

1. *Grande plaque s. g. à 3 grammes de lactate de soude.*

Le 9 février : ensemencement : terre *Esp.* 1 gramme.

Le 12 : épreuves encore négatives.

Le 13 : traces de réaction ammoniacale dans le gel libre de colonies.

Le 14 : le carré de papier tournesol rose fixé au couvercle vire au bleu. Dans le gel réaction marquée.

Le 15 : ce jour et les jours suivants le gel donne une réaction intense à l'épreuve de Nessler.

II. *Petite plaque s. g. à 0 gr. 3 de lactate de soude.*

Le 12 mars : ensemencement avec 0 gr. 2 de terre *Esp.*

Le 17 : la réaction du gel est bien nette. L'eau de condensation, nesslerisée, donne 1,5 d'azote ammoniacal (en centièmes de milligramme).

III. *Petite plaque à 0 gr. 3 de lactate de soude.*

Le 10 avril : ensemencée avec une suspension d'une colonie pure.

Le 12 : couche de mucus couvrant toute la surface. Examen microscopique des pullulations : elles sont restées pures. Ce jour même, virage du papier tournesol.

Le 14 : on soumet le gel à la distillation. Le distillat, nesslerisé, donne 4,0 d'azote ammoniacal.

IV. *Grande plaque s. g. à 2 gr. 5 de succinate de soude.*

Le 10 février : ensemencée avec 1 gramme de terre *Esp.*

Le 13 : premières traces de réaction dans le gel. Virage du papier tournesol au violet.

Le 14 : virage au bleu, odeur ammoniacale. Les grumeaux du gel prennent dans le réactif de Nessler une teinte rouille. Dans le thymol-sulfone-phthaléine tache bleu indigo.

V. *Grande plaque s. g. à 2 gr. 5 de succinate de soude.*

Le 14 février : ensemencement avec une délayure de colonies pures.

Le 15 : rosée de mucus sur toute la surface.

Le 16 : couche de mucus ininterrompue. Dans la thymol-sulfone-phthaléine tache bleu acier.

Le 17 : réaction positive du gel libre de colonies.

Le 20 : l'eau de condensation contient tant d'ammoniaque, qu'une gouttelette donne un précipité rouille dans le réactif. On rince plusieurs fois avec de l'eau bidistillée. On divise l'eau de lavage en 5 portions que l'on nesslerise. La quantité totale d'azote ammoniacal est 12,5. Ce dosage fait le matin, on le répète au milieu de la journée et on trouve encore 7,5 (toujours en centièmes de milligramme).

Pour le dosage de la quantité totale retenue dans le milieu à ce jour, on jette toute la masse du gel dans un ballon, on triture avec un peu d'eau et on chauffe au bain-marie en ventilant. On trouve 3 milligr. 36 d'azote ammoniacal.

VI. *Grande plaque s. g. à 2 gr. 5 de succinate de soude.*

Le 19 février : ensemencé avec une délayure de deux colonies pures parues sur une plaque au benzoate de soude.

Le 20 : des gouttelettes de mucus garnissent toute la surface.

Le 21 : au bout de quarante-deux heures, couche ininterrompue de mucus hyalin. Nesslerisation de l'eau de condensation : 7,0 d'azote ammoniacal. Ce même jour au bout de quelques heures : 2,0.

Le 22 : l'eau de rinçage nesslerisée donne 15 d'azote ammoniacal. Le gel prend dans le réactif la teinte rouille.

Le 24 : par ventilation accompagnée d'un léger chauffage on en extrait 1 milligr. 42 d'azote ammoniacal ; il en reste encore dans le ballon de distillation.

VII. *Grande plaque s. g. à 2 gr. 5 de succinate de soude.*

Le 24 novembre : ensemencement avec une petite dose de terre *Esp.* : 0 gr. 09.

Le 28 : léger virage du papier tournesol indiquant les premières traces d'alcali.

Le 30 : nesslerisation de l'eau de condensation : 1,5.

Le 1^{er} décembre : même épreuve : 1.

Le 4 : même épreuve : 0,5.

Le 7 : même épreuve : 0,1.

Le dégagement d'ammoniaque étant cette fois moins prononcé, on revient à des doses plus fortes de terre d'ensemencement.

VIII. *Grande plaque à 2 grammes de succinate de soude.*

Le 10 décembre : ensemencée avec 1 gramme de terre *Esp.*

Le 14 : virage du papier tournesol. Le gel produit une réaction marquée. L'eau de condensation donne 3,0 d'azote ammoniacal à la nesslerisation.

Le 16 : eau de condensation : 6,0. Examen microscopique : aucune pullulation étrangère aux *Azotobacters*.

Le 17 : par une courte distillation on extrait du gel 0 milligr. 29 d'azote ammoniacal.

Pour éprouver l'effet d'un autre échantillon de terre, au lieu de l'échantillon *Espalier*, dont on se sert ordinairement, on prépare un échantillon provenant de la parcelle *Pruniers*.

IX. *Grande plaque s. g. à 2 grammes de succinate de soude.*

Le 19 décembre : ensemencement avec une petite dose de l'échantillon *Pruniers* 0 gr. 1.

Le 22 : traces de réaction dans le gel. Eau de condensation : 3,0 d'azote ammoniacal. Même jour : 2,0 d'azote ammoniacal.

Le 24 : réaction marquée du gel. Eau de condensation : 2,5.

Le 25 : réaction intense du gel. Eau de condensation : 4,0.

Le 26 : réaction intense du gel. Eau de condensation : 6,0.

Le 28 : réaction intense du gel. Eau de condensation : 3,0 (toujours en centièmes de milligramme).

PLAQUES AU LACTATE DE CALCIUM. — Comme il a été déjà dit, il est probable que ce n'est pas la nature de l'acide lui-même qui est la cause du dégagement de l'ammoniaque, mais le rapide accroissement de la concentration en ions hydroxile et l'emploi des sels de soude qui produit cet effet. Pour s'en assurer, il n'y avait qu'à remplacer la combinaison sodique par la combinaison calcique.

I. *Grande plaque s. g. à 3 grammes de lactate de calcium.*

Le 10 février : ensemencée avec 1 gramme de terre *Esp.*

Le 13 : la surface est garnie de belles colonies blanches. La pullulation est presque aussi abondante que sur la mannite. L'épreuve du pH le montre inchangé.

A partir de cette date, on continue les épreuves du gel et de l'eau de condensation pendant huit jours, mais on ne constate la moindre trace de réaction. Il n'y a, bien entendu, aucun virage du papier tournesol.

On refait cinq fois la même expérience, dont trois fois en prenant la terre comme semence, une fois une suspension de colonies pures, enfin, une dernière avec une plaque gélosée. Le résultat a été en général négatif, de sorte que le détail des observations serait dépourvu d'intérêt. Malgré les végétations très abondantes, il est bien rare que l'on réussisse, et cela au prix d'épreuves très nombreuses, à saisir quelques traces d'ammoniaque dans l'eau de condensation; on n'en trouve jamais dans le gel. Le contrôle de la réaction montre qu'elle ne s'élève pas au-dessus de pH 7,6.

PLAQUES S. G. A ACÉTATE, BUTYRATE ET PROPIONATE DE SOUDE. — Il était à penser que les sels sodiques des acides acétique et butyrique normal, lesquels sont propres à servir de matières énergétiques aux *Azotobacters*, se comporteraient d'une manière analogue au lactate et succinate. C'est ce que démontrent les quelques expériences qui suivent.

Petite plaque s. g. à 0 gr. 3 d'acétate de soude.

Le 10 avril : ensemencée avec une suspension d'une colonie pure. Au bout de vingt-quatre heures : rosée abondante de mucus.

Le 12 : au bout de quarante-deux heures : couche hyaline ininterrompue. Virage du papier tournesol.

Le 14 : le pH est environ 9.

Le 15 : distillation de l'ammoniaque retenue dans le gel : on obtient 0 milligr. 4 d'azote ammoniacal.

L'expérience répétée encore deux fois donne sensiblement le même résultat.

Avec deux petites plaques à 0 gr. 3 de butyrate de soude on a obtenu un virage du papier tournesol et 3 et 5 d'azote ammoniacal à la nesslerisation.

De même avec une petite plaque de propionate de soude à 0 gr. 3.

PLAQUES A LA MANNITE. — Malgré le caractère négatif de nos anciennes observations sur les plaques mannitées, il paraissait désirable de refaire quelques expériences comparées avec cette substance, en appliquant les mêmes épreuves suivies, qui permettent de saisir un dégagement très faible et passager. Les résultats restent en général négatifs comme avec le lactate de chaux. Mais si l'on multiplie les épreuves, on réussit de temps en temps, en somme bien rarement, à constater çà et là quelques traces d'ammoniaque, jamais dans les cultures jeunes, mais dans les cultures de six jours et plus, qui commencent à brunir.

I. *Grande plaque s. g. à 2 grammes de mannite.*

Le 2 février : ensemencée avec 1 gramme de terre *Esp.*

Depuis le 12 février, épreuves journalières jusqu'au 19 février. Toutes sont négatives : ni virage du papier tournesol, ni jaunissement de parcelles de gel, rien dans la rosée de condensation.

Le 18 : on prélève sur 10 points des petits grumeaux de gel que l'on jette dans le réactif de Nessler : 3 d'entre eux montrent un jaunissement faible, mais net, le reste est incolore. Quelques traces d'ammoniaque viennent donc d'apparaître, mais tardivement.

II. *Deux petites plaques s. g. à 0 gr. 2 de mannite.*

Le 19 février : ensemencées avec une suspension d'une colonie pure. Au bout de quinze heures : couche de mucus ininterrompue sur les deux. On les soumet pendant huit jours à toutes les épreuves selon les méthodes adoptées, on ne découvre la moindre trace d'ammoniaque.

Ce résultat négatif s'est reproduit dans plusieurs autres expériences. Quand on constate une réaction de Nessler dans la rosée de condensation, ce ne sont toujours que des traces qui apparaissent, comme nous l'avons dit, toujours tardivement. Voici ces cas :

III. *Petites plaques gélosées.*

Le 3 avril : ensemencée avec une suspension d'une colonie pure. Les épreuves restent négatives jusqu'au 18 avril. Ce jour en nesslerisant un distillat, on trouve 0,4 d'azote ammoniacal.

Le 24 novembre : ensemencée avec 0 gr. 1 de terre *Esp.* Culture exubérante.

Jusqu'au 30 novembre, aucune trace d'ammoniaque nulle part. Ce jour, la plaque déjà brunissante, on trouve dans l'eau de condensation 0,5 d'azote ammoniacal.

Il y avait lieu de se demander si une réaction s'approchant de $pH = 9$ ne provoquerait pas de même un dégagement d'ammoniaque sur le milieu à mannite. Dans ce but, on a préparé un lot de plaques à mannite, portées au pH voulu par des doses croissantes d'une solution de potasse à 2 p. 100. Mais on s'est heurté à la difficulté de voir ce pH élevé rétrograder au bout d'une dizaine d'heures jusqu'à 7,8, de sorte que toutes les plaques de l'échelle ne présentaient plus aucune différence de réaction. On a essayé un autre moyen de la maintenir qui consiste à enlever un segment du gel et de verser de temps en temps dans le creux quelques gouttes d'une faible solution de carbonate de potasse. Dans une expérience de ce genre on a obtenu, en effet, un virage du papier tournesol et une réaction de Nessler. On arrive au but plus facilement en ajoutant à la

mannite une dose de succinate de soude, mais, avec des mélanges comme celui-ci, on revient évidemment au cas déjà étudié, où le blocage de l'ammoniaque est dû à la concentration rapidement croissante des ions HO .

PLAQUES ALCOOLISÉES. — Il importait de rechercher si le dégagement d'ammoniaque peut aussi avoir lieu dans des conditions où le facteur alcalinité n'intervient pas. On les a trouvés dans l'emploi des plaques à l'alcool éthylique et butylique normal, comme seules substances énergétiques. Pour préparer des plaques de s. g. alcoolisées, il est nécessaire de prendre une forte dose d'alcool allant jusqu'à 10 cent. cubes d'alcool absolu ou à 95° pour une grande plaque et 2 cent. cubes pour une petite, car la majeure partie en est perdue pendant l'évaporation. Il en reste ainsi une dose non excessive, susceptible de provoquer une pullulation abondante. Pour préparer de la gélose alcoolisée, on ne prend que 1 cent. cube d'alcool éthylique ou butylique pour 100 cent. cubes de gélose-sels, en l'ajoutant dans la gélose stérilisée et refroidie à 40°. Pour l'alcool butylique, ces doses se montrent parfois excessives. Comme il a été décrit ailleurs (cinquième mémoire), l'alcool éthylique paraît un aliment de prédilection pour les *Azotobacters* à une concentration convenable; l'alcool butylique est un peu moins favorable, les végétations étant plus sensibles à tout excès.

I. Petite plaque s. g. à 2 cent. cubes d'alcool éthylique.

Le 12 avril : ensemencée avec 0 gr. 2 de terre *Esp.*

Le 19 : virage net du papier tournesol; le $p\text{H}$ du gel ne dépasse pas pour tant sensiblement 7,0. En soumettant une partie du gel à la distillation et à la nesslerisation, on trouve 3,0 d'azote ammoniacal.

II. Grande plaque s. g. à 10 cent. cubes d'alcool éthylique.

Le 4 novembre : ensemencée avec 0 gr. 18 de terre *Esp.* (petite dose).

Le 6 : développement abondant. On introduit dans l'intérieur de la plaque retournée, couvercle en bas, une soucoupe plate chargée de 5 cent. cubes d'acide sulfurique $\text{N}/4$, et on l'abandonne pendant une dizaine de jours. On procède de même avec une plaque du même milieu non ensemencée et avec une troisième à alcool butylique n'ayant pas donné de culture notable.

Le 16 : on verse l'acide dans un ballon, on ajoute de la soude, on distille en recueillant dans 10 cent. cubes d'acide $\text{N}/10$, on titre avec une solution de baryte.

Titre : 10 cent. cubes acide correspondent à 32 c. c. 9 de baryte.

La plaque témoin prend 32 c. c. 85.

La plaque à alcool butylique, 32 c. c. 9.

La plaque à alcool éthylique, 31 c. c. 2.

La différence est donc 1 c. c. 7, ce qui correspond à 0 milligr. 72 d'azote ammoniacal.

La plaque est maintenue encore environ trois semaines à l'étuve, en la soumettant presque journellement aux épreuves. Cette durée d'observation exigeait une surveillance spéciale, pour juger s'il n'y avait pas de phénomène de décomposition, auquel on pourrait, à vrai dire, sans beaucoup de probabilité, attribuer la production d'ammoniaque. Pour répondre à cette critique, on soumettait les végétations à un examen microscopique répété en faisant des préparations de mucus pris sur plusieurs points. On a bien remarqué quelques germes étrangers isolés, mais aucune pullulation étrangère tant soit peu envahissante n'a été observée jusqu'au bout. Ce qui a attiré l'attention, c'étaient de petits groupes de cellules d'*Azotobacters* nettement lysées, incolores, entre des cellules bien caractéristiques à l'état arrondi, enkystées, qui formaient jusqu'au bout la grande masse des végétations.

Voici la liste des épreuves de nesslerisation de l'eau de condensation à partir du 18 novembre jusqu'au 5 décembre. Le gel a donné, du premier jour au dernier, une réaction de Nessler bien nette.

DATES	AZOTE ammoniacal	DATES	AZOTE ammoniacal
18	8,0	27	3,0
19	4,0		2,5
20	6,0	29	2,0
21	4,0	30	1,5
22	6,0	1	0,5
23	4,0	2	0,3
24	3,0	4	1,0
25	3,0	5	0,2
26	4,0		

Depuis le 1^{er} décembre, le gel a perdu tant d'eau qu'il se transforme en petites écailles presque sèches, ce qui oblige finalement à terminer l'expérience. Un dernier examen donne le même tableau de cellules azotobactériennes autolysées. Aucune pullulation étrangère, tant soit peu marquée.

III. *Grande plaque s. g. à 10 cent. cubes d'alcool éthylique.*

Le 24 novembre : ensemencée avec 0 gr. 8 de terre *Esp.*

Le 30 : jusqu'à ce jour, les épreuves sont négatives. Ce jour-là, il y a traces d'ammoniaque dans la rosée de condensation qui ne dépassent pas 0,5. Les épreuves répétées encore trois jours restent négatives.

IV. *Grande plaque s. g. à 10 cent. cubes d'alcool éthylique.*

Le 10 décembre : ensemencée avec 1 gramme de terre *Esp.* Se couvre de colonies au bout de quarante-huit heures.

Le 14 : pas de virage du papier tournesol, ni réaction dans le gel. Traces dans l'eau de condensation : 0,7.

Le 16 décembre : légère réaction du gel. Eau de condensation : 1,5.

Le 17 : le gel donne une réaction intense : teinte rouille. Examen microscopique : la pureté du tableau ne laisse rien à désirer.

Distillation du gel trituré dans de l'eau sans ajouter aucune base. On recueille le distillat dans de l'acide N/10. On titre avec de la baryte N/33 : Azote ammoniacal : 3 milligr. 05.

V. *Grande plaque s. g. à 10 cent. cubes d'alcool éthylique.*

Le 19 décembre : ensemencée avec 0 gr. 1 de terre *Pruniers.*

Le 21 : colonies peu nombreuses, plaque peu couverte.

Le 22 : on trouve dans l'eau de condensation des traces d'azote ammoniacal, ne dépassant pas 0,3.

On répète les épreuves jusqu'au 29 décembre, mais il n'y a toujours que des traces, au maximum 0,7 d'azote ammoniacal.

VI. *Grande plaque s. g. à 10 cent. cubes d'alcool éthylique.*

Le 19 décembre : ensemencée avec une suspension de colonies pures.

Le 21 : premières traces d'azote ammoniacal dans l'eau de condensation.

Le 22 : réaction de Nessler dans le gel.

On continue les épreuves jusqu'au 28 décembre, toujours avec un résultat positif, mais il n'y a toujours que des traces ne dépassant pas 0,5.

Quant à l'alcool butylique, on a constaté dans une expérience un virage du papier tournesol au sixième jour, des traces d'azote ammoniacal dans l'eau de condensation, mais on n'a pas fait d'expériences suivies. Il est probable que les résultats seraient analogues à ceux qui viennent d'être exposés.

On voit que le dégagement d'ammoniaque aux dépens des alcools dans ces conditions est un fait à peu près constant, mais qu'il est moins marqué et plus tardif que sur les plaques à sels organiques ; la réaction du milieu restant au voisinage de la neutralité, l'ammoniaque formée a tendance à s'accumuler dans le gel.

Remarquons enfin que dans d'autres conditions, à savoir, sur des plaques de gélose alcoolisée à 1 p. 100 que l'on ensemait en série par repiquages toujours sur le même milieu, les épreuves restaient négatives : on ne retrouvait plus traces d'ammoniaque, ni dans les jeunes cultures, ni dans les cultures

âgées. Doit-on chercher la raison de ces faits négatifs dans un regain d'équilibre des processus intéressés à la suite d'une culture prolongée dans des conditions constantes? — Il est difficile de le dire.

PLAQUES CHLOROFORMÉES ET TOLUÉNÉES. — Aux deux cas de dégagement de l'ammoniaque, dont l'un est dû à l'alcalinité du milieu, l'autre à un facteur moins apparent, nous pouvons joindre un troisième, qui est le fait des anesthésiants ou antiseptiques, en l'espèce le chloroforme et le toluène.

On conçoit combien les expériences de ce genre sont délicates à cause de la nécessité de trouver la juste mesure de l'action inhibitrice, à défaut de quoi on risque de désorganiser la cellule trop rapidement par une intervention brutale. Pour étudier le problème à fond, il aurait donc fallu un grand nombre d'expériences préliminaires qu'on a voulu éviter en simplifiant la tâche. Justement, le fait que les plaques à la mannite et au lactate de calcium ne dégagent jamais de l'ammoniaque à l'état jeune, c'est-à-dire, au bout de deux, trois fois vingt-quatre heures, était bien de nature à la faciliter. Il n'y avait qu'à tenter d'y provoquer, dans les limites de ce délai, plus ou moins régulièrement, une réaction de Nessler assez nette, soit dans de l'eau de condensation, soit dans le gel; ou bien un virage du papier tournesol. On a fait trois expériences dans cette direction.

I. *Une grande plaque au lactate de calcium et une grande plaque à la mannite* (mêmes formules que précédemment), âgées les deux de moins de quarante-huit heures, couvertes d'une couche épaisse de mucus bactérien, sont placées chacune dans une grande boîte avec à côté un tampon imbibé de chloroforme. On fixe à l'intérieur de la boîte une petite bande de papier tournesol. Au bout de dix heures, on enlève le tampon et on abandonne les plaques sur une table de laboratoire. Au bout de six heures, on remarque un début de virage du papier tournesol.

II. *Deux grandes plaques au lactate de calcium et trois petites* sont soumises, au bout de quarante-deux heures de végétation, à l'action du chloroforme durant vingt heures.

Dans l'une des grandes plaques, on trouve, à la nesslerisation, 1,0 d'azote ammoniacal dans l'eau de condensation. Dans l'autre, il n'y en a que des traces. Dans les trois petites, on note à l'épreuve, de Nessler un jaunissement du gel, faible mais net. L'eau de condensation enlevée des couvercles de toutes les trois donne à la nesslerisation une réaction équivalente à 2,5 d'azote ammoniacal, soit une réaction très intense.

III. *Quatre petites plaques au lactate de calcium et quatre petites plaques à la mannite*, toutes ensemencées avec une colonie pure.

Au bout de quarante heures : couche épaisse de mucus sur toutes les plaques. On éprouve avec le réactif de Nessler et l'on ne trouve aucune trace d'ammoniaque. On place alors deux plaques appartenant aux deux lots dans une grande boîte munie d'un tampon de chloroforme, les deux autres dans une autre chargée d'un tampon imbibé de toluène. Les quatre autres sont gardées à l'étuve comme témoins.

Au bout de cinq heures, on soumet toutes les plaques chloroformées et toluénées à la nesslerisation, mais on ne trouve rien. Deux sont alors remises dans les grandes boîtes à chloroforme et à toluène, où elles restent encore vingt heures; les deux autres sont gardées à l'étuve une douzaine d'heures. Les épreuves montrent alors dans ces deux dernières, dont une plaque à la mannite toluénée cinq heures et l'autre une plaque au lactate de calcium chloroformée cinq heures, une réaction positive du gel. Les deux plaques ayant subi plus longtemps les vapeurs nocives ne donnent aucune réaction. Les quatre témoins restent tout le temps libres d'ammoniaque.

RECHERCHES DE L'AMMONIAQUE RETENUE DANS LES CELLULES DES AZOTOBACTERS. — Toutes les épreuves mentionnées jusqu'ici touchent au gel libre de colonies et aux émanations des cultures dans l'air confiné des boîtes de culture. Elles ont été, comme on l'a vu, tantôt positives, tantôt négatives, ce qui fait conclure que le *dégagement* de l'ammoniaque dans l'ambiance par les *Azotobacters* dépend des conditions de leur pullulation.

Le dégagement, mais non la production! Car si l'ammoniaque est vraiment le produit primaire de fixation, il est évident que cette ammoniaque synthétique — ne fût-ce qu'à l'état de traces — doit être à peu près constamment présente dans les cellules en voie de développement qui sont le lieu même de la synthèse. En effet, toutes les fois que l'on a éprouvé, non le gel libre de colonies, mais le gel couvert de mucus bactérien, dont on découpait des morceaux plus ou moins grands et que l'on soumettait à la distillation, on a constaté des traces d'ammoniaque dans des cultures où aucun dégagement ne se laissait découvrir en général.

Cependant, avec notre mode de culture, rien n'est plus facile que d'avoir du mucus bactérien pur, bien séparé du milieu. Sur des plaques à la mannite et au lactate de calcium ensemencées avec une suspension de colonies pures, on a, au bout de quarante-huit heures, une couche épaisse de glaire semi-fluide que l'on peut couler à volonté dans un récipient quelconque. Au besoin, on peut enlever rapidement toute la

couche glaireuse en y versant un peu d'eau et en s'aidant d'un pinceau à poils doux.

Pour avoir toutes les garanties que les traces les plus faibles d'ammoniaque proviennent réellement des corps microbiens, il est recommandable de procéder comme il suit : on se sert d'une cornue tubulée, reliée à un réfrigérant sans joint de caoutchouc ; on commence par y verser environ 150 cent. cubes d'eau bidistillée exempte d'ammoniaque, et on distille à blanc en recueillant le distillat dans un tube de nesslerisation jusqu'à la marque de 50 cent. cubes ; on interrompt alors la distillation, on laisse refroidir et on fait tomber dans la cornue, à travers la tubulure, en s'aidant d'une baguette, quelques gouttes de mucus bactérien, après quoi on reprend la distillation en recueillant dans un second tube de nesslerisation ; on laisse alors tomber dans chacun des tubes, comme d'ordinaire, goutte à goutte, 2 cent. cubes de réactif. Le premier distillat devra rester incolore, tandis que le jaunissement dans le second sera immédiat, et non seulement cela, mais on s'assurera bientôt que, dans la majorité des cas, la réaction est si intense que l'on n'a guère besoin de tant de précautions. En voici quelques exemples.

Culture sur grande plaque à la mannite de deux jours.

Mucus blanc composé de végétations pures. Après la distillation à blanc, on fait tomber dans la cornue une dizaine de gouttes de mucus. On distille pendant une dizaine de minutes jusqu'à la marque, on nesslerise les deux tubes. Le premier ne donne absolument aucune trace, le second équivaut par sa teinte bien jaune au tube standard 1,0 azote ammoniacal.

L'expérience, répétée avec de petites quantités de mucus, donne toujours un résultat positif plus ou moins accentué, selon la quantité de substance microbienne que l'on mélange à de l'eau bidistillée.

Enfin, dans une dernière expérience, on enlève rapidement la totalité de la couche glaireuse blanche, couvrant toute la surface d'une *grande plaque à 2 gr. 0 de mannite*. On le fait au moyen de 150 cent. cubes d'eau bidistillée, que l'on verse par portions sur la plaque, et de là la suspension dans la cornue. Le premier distillat de 50 cent. cubes donne, à la nesslerisation, 2,0 d'azote ammoniacal, soit une réaction très intense. On continue en ajoutant de l'eau distillée, et on a :

Deuxième distillat.	2,0
Troisième distillat.	1,5
Quatrième distillat.	1,5
Cinquième distillat	1,5

d'azote ammoniacal en centièmes de milligramme. L'intensité de la réaction ne baissant pas sensiblement, il aurait fallu distiller plusieurs heures pour

enlever l'ammoniaque jusqu'au dernier reste, comme c'est toujours le cas quand il s'agit de solutions à réactions neutres; on interrompt donc l'expérience qui démontre suffisamment la présence de quantités dosables d'ammoniaque dans la matière même des microbes.

MUCUS AZOTOBACTÉRIEN ÉMULSIONNÉ DANS DE LA GLYCÉRINE. —

L'observation que les végétations azotobactériennes émulsionnées dans de la glycérine continuent, ou même commencent à dégager de l'ammoniaque nous a conduit à étudier ce phénomène de plus près, en opérant de deux manières :

1° On enlève le mucus d'une grande plaque au moyen de 50 cent. cubes d'eau bidistillée; on verse la suspension dans une grande boîte de culture, on y mélange le même volume de glycérine bidistillée; on laisse sur une plaque chauffée à 42°-45° jusqu'à ce que l'émulsion devienne épaisse comme de la glycérine pure.

2° On sèche la culture en laissant les boîtes ouvertes sur la plaque chaude (max. 45°) pendant vingt-quatre heures et plus. Le gravier silicique couvert de mucus séché est alors écrasé dans un grand mortier et réduit en poudre impalpable au moyen d'un pilon massif. Le sable fin, environ une dizaine de grammes, qui se forme, suffit pour assurer la destruction mécanique des cellules; toute autre matière pulvérulente est à éviter (1). On ajoute alors 20 cent. cubes de glycérine bidistillée et on travaille la masse avec le pilon jusqu'à consistance d'une pommade homogène; en y mélangeant par portions 25 cent. cubes d'eau bidistillée, on transvase la masse dans une boîte de culture et l'on évapore à douce chaleur jusqu'à consistance sirapeuse. C'est ce dernier mode d'opérer qui paraît le meilleur.

Les grandes boîtes de culture avec les émulsions glycinées des deux genres étaient conservées dehors, dans un réduit à température hivernale dans l'intervalle entre les épreuves. Avant les épreuves on les tenait quelques heures à la température de la chambre, ou à l'étuve à 30°; on les mettait, enfin, sur la plaque chaude (42-45°) en les couvrant d'une fiole réfrigérante. Un quart d'heure suffisait pour provoquer une rosée

(1) La terre d'infusoires que l'on emploie parfois pour le même but est particulièrement à éviter; nous en avons observé un échantillon qui dégageait de l'ammoniaque dans les conditions de nos épreuves.

assez abondante que l'on nesslerisait de la manière décrite.

Un grand nombre de ces épreuves ont été faites sur une dizaine d'émulsions glycélinées — préparées avec des cultures jeunes et âgées — étendues en couche mince dans des grandes boîtes de culture. Pour contrôle, on soumettait de la glycérine bidistillée de commerce, coupée d'un peu d'eau bidistillée exempte d'ammoniaque aux mêmes épreuves, exactement dans les mêmes conditions. On a bien obtenu quelques traces de réaction en nesslerisant l'eau de condensation, qui ne dépassait pas pourtant l'échelon 0,4; mais la différence entre ces témoins et les émulsions des cultures, surtout celles qui ont été préparées d'après le procédé 2, a toujours été très notable. Ajoutons que ces réactions se maintenaient pendant plusieurs semaines avec parfois une tendance à augmenter. Sans plus insister sur ce sujet, les quelques exemples qui suivent suffiront pour donner une idée de l'intensité relative des réactions que l'on obtient.

1. Plaque au lactate de calcium. Culture âgée. Durée d'observation une vingtaine de jours. Epreuves tous les jours ou tous les deux jours.

Azote ammoniacal : 0,5; 2,2; 4,5; 4,0; 1,5; 2,5; 2,5; 2,0; 2,2; 2,5; 2,0.

2. Plaque à la mannite, culture jeune. Même durée d'observation.

Azote ammoniacal : 0,5; 0,7; 0,5; 0,7; 0,5; 0,8; 0,6; 0,5; 0,5; 0,7; 0,7.

3. Lactate de calcium, culture jeune. Même durée.

Azote ammoniacal : 0,5; 4,0; 0,7; 4,0; 0,8; 0,9; 4,0; 0,5; 0,8; 4,5.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

I. En commençant par le dernier groupe d'expériences, la question se pose de savoir si elles apportent la preuve d'une action enzymatique que les expériences avec des végétations chloroformées et toluénées paraissaient déjà indiquer. Vu surtout les données concordantes des deux groupes d'expériences, on serait disposé à répondre affirmativement.

Dans ce cas, la déshydrogénation qui doit fournir l'hydrogène nécessaire à la synthèse serait due à une *déshydrogénase* qui agirait sur les matières de réserve des cellules, tant vivantes que mortes; et, de cet hydrogène activé, l'azote moléculaire serait l'accepteur. Mais l'activation de l'hydrogène, ou l'oxydo-réduction, étant, selon les idées actuellement dominantes, un phénomène général en biochimie, tandis que la fixation est au

contraire une fonction très rare, on serait amené à admettre pour ce cas un catalyseur spécial, jouant le rôle des catalyseurs métalliques dans le procédé industriel. Certes, l'interprétation n'est en l'état actuel qu'une hypothèse de travail, le problème exigeant encore bien des études.

En particulier, il est encore difficile d'écarter une objection à cette manière de voir, qui touche à la provision d'ammoniaque retenue par les cellules au moment de leur destruction : quelque peu importante que soit cette provision, si elle ne se perd pas, elle pourrait peut-être suffire pour un grand nombre d'épreuves de distillation lente, comme on les a pratiquées, avec un résultat positif. Il est vrai que l'on a pris bien des soins pour chasser cette ammoniaque préformée, en séchant les plaques à 42-45° pendant un à plusieurs jours, en évaporant les émulsions glycinées durant cinq à vingt-quatre heures à la même température, et cela à plusieurs reprises. Malgré ces soins et sans paraître s'en ressentir, les émulsions continuaient à exhaler sensiblement les mêmes quantités d'ammoniaque à de rares exceptions près.

Quoi qu'il en soit, la difficulté d'éloigner les dernières traces d'ammoniaque d'un milieu, sans recourir à des alcalis fixes, à la température d'ébullition, ou à des pressions négatives, ne permet encore aucune conclusion définitive touchant la synthèse de l'ammoniaque au sein de l'émulsion glycinée. On se bornera donc actuellement à une conclusion qui ne résume que les faits observés, à savoir : *le dégagement d'ammoniaque continue après la destruction des cellules azotobactériennes, ou même parfois ne commence qu'après leur désorganisation, et ce dégagement peut être suivi pendant plusieurs jours.*

II. Si l'on hésite à admettre comme prouvée l'existence d'un appareil enzymatique, d'après l'hypothèse ci-dessus exposée, il ressort tout de même des expériences que la *production de l'ammoniaque d'un côté, son assimilation de l'autre, ne sont pas liées indissolublement dans une seule et même réaction de synthèse*; car, s'il en était ainsi, la déshydrogénation des substances de réserve de la cellule, accompagnée de l'hydrogénation de l'azote moléculaire, ne marcherait qu'au rythme de la synthèse de la matière protéique, sans qu'il y ait jamais apparition d'ammoniaque libre; et ce serait évidemment l'idéal au point de

vue de l'économie cellulaire. Qu'il n'en soit pas ainsi, que *le processus entier de l'assimilation de l'azote gazeux s'accomplisse en deux phases, dont l'équilibre paraît instable, cela est démontré par le fait même du dégagement de l'ammoniaque dans l'ambiance.*

Cette instabilité apparaît très clairement dans nos expériences. Les pullulations, qui se font aux dépens d'aliments « riches » (glucose, mannite, lactate de calcium), n'en dégagent pas généralement ce qui s'explique aisément par l'intensité de leur processus assimilatoire ; dans ce cas, le reste entre la production, d'un côté, la consommation, de l'autre, est nul. Il devient très appréciable dans le cas provoqué d'une rapide alcalinisation du milieu jusqu'à environ $pH = 9,0$; le produit primaire, bloqué, s'accumule alors dans le milieu, l'assimilation subissant un arrêt complet, ou presque. Le même effet a été remarqué, quoique avec moins de précision, dans des cultures soumises aux vapeurs de chloroforme et de toluène. La conclusion paraît donc justifiée que *toute entrave au processus assimilatoire des cellules conduit à un arrêt dans l'utilisation de l'ammoniaque, dont la production pourtant continue, ce qui doit avoir pour effet une surcharge des cellules qui finissent par rejeter cette ammoniaque inutilisable dans le milieu, avec d'autres produits de dissimilation.*

III. Au point de vue du rôle dans la nature, il est important de retenir que le dégagement n'est pas seulement provoqué par tel ou tel autre artifice, mais qu'il a lieu spontanément. La culture sur des plaques à l'alcool éthylique — substance que les *Azotobacters* doivent trouver fréquemment dans le sol autour des foyers de fermentation de la matière végétale — en présente le meilleur exemple. En suivant le cours de ces expériences, on remarque généralement que l'apparition de l'ammoniaque y est plus tardive que sur le lactate et le succinate de soude ; et ce que l'on a noté plusieurs fois, c'est qu'elle *coincide assez nettement avec la disparition de l'odeur alcoolique.* Jusqu'alors dépourvues de toute trace d'ammoniaque, les cultures commencent subitement à donner une réaction positive à toutes les épreuves : virage du tournesol, jaunissement dans le gel et l'eau de condensation à la nesslerisation. L'observation ne présente rien d'inattendu : on conçoit que

l'épuisement de la réserve en aliment a pour conséquence immédiate un ralentissement ou un arrêt des pullulations, qui subissent une période critique avant de passer à l'état de repos : un déséquilibre des fonctions est donc particulièrement facile à admettre à ce moment.

Moins prononcée quantitativement, la même observation s'applique aux plaques à la mannite et au lactate de soude qui ne dégagent pas, comme on l'a vu, d'ammoniaque à l'état jeune, mais qui en donnent des traces quand le brunissement du mucus commence à s'étendre. En résumé, il y aurait lieu de généraliser cette cause et d'admettre ainsi que *les cultures qui déclinent faute de matière énergétique sont susceptibles de rejeter leur ammoniaque dans le milieu.*

IV. Les souches d'*Azotobacters* se comportent-elles de la même manière au point de vue qui nous intéresse? La question ne pourra, évidemment, être résolue qu'à force d'études spéciales dans cette direction sur les races du sol. Il semble, *a priori*, qu'il n'y aurait aucune raison de penser que la production d'ammoniaque, due à un équilibre instable, soit égale ou constante chez les différentes races et même chez une seule et même souche; il est plutôt à croire que *des facteurs naturels, infiniment variés, peuvent exalter ou réduire cette particularité dans de larges limites.* C'est justement à cette instabilité, parfois déconcertante, que nous attribuons de n'avoir pas retrouvé au cours de nos expériences — exécutées à deux reprises avec un temps d'arrêt assez long — l'intensité de la production d'ammoniaque des premières séries d'expériences, où les plaques nous frappaient par une odeur ammoniacale intense. On se demande aussi si les résultats de Kostytchew ne pourraient trouver leur explication dans ce qu'il a eu la chance de tomber sur une souche particulièrement active comme productrice d'ammoniaque à la suite d'un déséquilibre de son processus assimilatoire.

V. Enfin, en ce qui concerne les suites du phénomène de fixation, les résultats obtenus apparaissent d'une importance décisive : *le rôle fertilisant des Azotobacters, producteurs d'ammoniaque synthétique, ne saurait être mis en doute. Que cette production s'exerce au sein du sol, on ne voit également aucune raison d'en douter.* Bien plus, l'on se figure volontiers, d'après les sug-

gestions de ce mémoire, que c'est justement dans ce milieu naturel que l'on trouvera réalisées les conditions qui favorisent ce dégagement, à savoir : aliments « pauvres », régime variable, périodes de pullulation entrecoupées d'intervalles d'inanition et de désorganisation ; bref, toutes sortes d'influences de nature à entraver ou à déséquilibrer les processus de développement, avec un dégagement d'ammoniaque pour suite.

L'apport de l'azote assimilable par l'activité des *Azotobacters* n'est donc pas dû seulement, comme on l'a cru si longtemps, à un phénomène indirect et de longue haleine, qui ne s'accomplit qu'à la suite de la décomposition de la matière de leurs cellules mortes par l'action d'autres agents bactériens. Ce rôle est immédiat et direct, les foyers de leurs pullulations présentant assez souvent, si ce n'est toujours, une source plus ou moins abondante d'ammoniaque synthétique ; et cette source ne semble pas se tarir immédiatement à la mort et à la désorganisation de leurs cellules.

Quant à celles qui restent vivantes à l'état enkysté, elles paraissent assez résistantes pour garder leur azote organique jusqu'à nouvelle occasion : à cet état, elles ne représentent donc qu'un pouvoir potentiel de fixer l'azote au moment opportun, c'est-à-dire, à la suite d'une nouvelle provision de matière énergétique au sein d'un milieu dont la réserve en azote assimilable est descendue à un niveau ne permettant plus la pullulation des non-fixateurs.

Ainsi, se trouve résolue, d'après ces idées, la triple énigme des *Azotobacters*, concernant :

1° La matière énergétique dont ils disposent dans le sol : ce sont les produits de fermentation de la matière végétale ;

2° Le produit primaire de la fixation : c'est l'ammoniaque synthétisée par les cellules ;

3° Enfin leur fonction utile : elle est de maintenir la réserve en azote combiné dans les sols qui en manquent, au moyen de l'hydrogénation de l'azote atmosphérique.

Errata. — Numéro de janvier, p. 124, légende de la figure : au lieu de *Nitratisation* lire *Nitritation* ; p. 123, légende de la figure : au lieu de *Nitrato-ion* lire *Nitritation*.

UN CAS DE RAGE PRODUIT PAR UN VIRUS RABIQUE DES RUES A VIRULENCE RENFORCÉE, OBSERVÉ A HANOÏ.

par J. BABLET et H. MARNEFFE.

Depuis la création de l'Institut Pasteur de Hanoï, nous avons étudié un certain nombre de virus des rues — d'origine canine ou d'origine humaine — dans le but de rechercher le bien-fondé de la réputation d'extrême virulence du virus tonkinois. Une note récente (1) enregistrait les résultats obtenus au cours des quatre premières années : il y aurait au Tonkin trois fois plus de cas de rage précoces qu'en Europe (avant le trentième jour) et plus particulièrement un chiffre élevé d'incubations très courtes (moins de dix-huit jours). Ces conclusions s'appliquaient à peu près exclusivement aux Annamites et nous pensions que l'hyponutrition et la misère physiologique pouvaient jouer un rôle dans le raccourcissement de la période d'incubation chez les indigènes.

Nous venons d'observer, cependant, chez un Européen, jeune et en bon état physique, un cas de rage déclarée consécutif à une morsure légère et survenu à la fin d'un traitement d'intensité moyenne. La mort a suivi les premiers symptômes à deux jours d'intervalle. Soupçonnant un virus naturellement renforcé, nous avons pratiqué l'inoculation expérimentale du bulbe prélevé à l'autopsie et constaté que le lapin, paralysé le quatrième jour, mourait vingt-quatre à quarante-huit heures après. Ce virus des rues évoluait chez le lapin plus rapidement que le virus fixe de Pasteur. Nous ne possédons, malheureusement, pas la souche canine de ce virus, l'animal mordeur n'ayant pu être retrouvé. Il eût été intéressant de rechercher le pouvoir immunisant d'un tel virus fixé sur le lapin. Nous avons essayé de nous en rendre compte en partant du virus humain.

(1) BABLET et JOYEUX. Sur la virulence du virus des rues tonkinois. *Ces Annales*, 44, février 1930, p. 141.

Nous exposons ci-dessous, à titre documentaire, l'observation clinique de rage humaine et le protocole résumé des inoculations expérimentales auxquelles elle a donné lieu.

OBSERVATION CLINIQUE. — M. L..., trente-huit ans, a été mordu le 25 mai 1930, dans l'après-midi, par un chien qui venait d'être capturé par le Service de la Voirie alors qu'il errait sans collier dans les rues de Hanoi. Il avait cru reconnaître cet animal et l'avait caressé. La morsure, peu profonde, siégeait près de la base du pouce. Elle fut cautérisée à l'alcool à 90°. Traitement commencé le 27 mai, terminé le 10 juin :

Formule A. Quinze jours, moelles de six, cinq, quatre, trois et deux jours (conservées au moins six jours, au plus douze jours en glycérine).

D'après les renseignements fournis par la police, le chien mordeur avait été mis en observation à la fourrière. Celle-ci signale immédiatement à l'Institut Pasteur les décès de ses pensionnaires ou leur remise en liberté, la période d'observation terminée. Or, dans ce cas particulier, il fut impossible, lorsque M. L... cessa le traitement, au quinzième jour, de retrouver l'animal qui l'avait mordu. Il est probable qu'il avait été abattu par erreur.

Aucun incident pendant le traitement. Le 9 juin, cependant, M. L... signale à son médecin habituel une sensation de constriction thoracique assez pénible. Le 10 au soir, c'est-à-dire le jour même de la dernière piqûre et le seizième après la morsure, M. L... manifeste une nervosité inaccoutumée et se sent mal à l'aise; il appelle dans la nuit son médecin qui lui fait une piqûre de morphine et lui conseille d'entrer à l'hôpital.

Le 11 au matin, on constate une hyperesthésie très marquée des téguments et un état de contracture généralisé. La paroi abdominale, en particulier, est dure comme du bois. Le faciès est anxieux, les yeux hagards. Néanmoins, la lucidité est complète. Le malade peut boire; il a uriné. La morphine le calme nettement. Il présente dans la journée des vomissements bilieux. Température : 38°.

La nuit est calme, grâce à la morphine. Le 12 au matin, de nouveaux vomissements surviennent. Le faciès est de plus en plus angoissé, l'agitation extrême, mais les mouvements gênés par la contracture musculaire et des convulsions tétaniformes. La mort survient brusquement à 9 heures.

Autopsie le jour même. Pas de lésions viscérales.

A l'ouverture du crâne, congestion veineuse intense sans altérations des méninges. Liquide céphalo-rachidien clair. Prélèvement de l'encéphale qui est placé dans le formol à 15 p. 100. Le bulbe est conservé en glycérine pour inoculation expérimentale.

En résumé, il s'agissait donc d'une maladie à symptomatologie et à localisation principalement nerveuses dont la période d'état n'a pas dépassé quarante-huit heures et s'est terminée brusquement par la mort. Une morsure de chien, peu profonde, à la main, avait précédé de seize jours les premiers symptômes. Même en l'absence des signes classiques de rage (hydrophobie, spasme du pharynx, salivation), on ne pouvait guère songer à un autre diagnostic.

L'émulsion du bulbe prélevé à l'autopsie fut inoculée à quatre lapins sous la dure-mère dans les conditions habituelles; d'autre part, des ensemencements furent faits sur divers milieux aérobies et anaérobies.

Aucun germe ne cultiva. Mais les quatre lapins inoculés étaient paralysés dès le quatrième jour et l'un deux mourait le cinquième.

Le diagnostic de rage se trouvait confirmé ainsi que la virulence élevée du virus en cause.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES.

LAPINS. — Les passages de virus ont été faits sur des lapins de 1.500 grammes à 2 kilogrammes par inoculation sous-dure-mérienne de 0 c. c. 5 d'émulsion bulbaire à 1/50. Certains passages ont été faits avec le bulbe frais, aussitôt après la démoellation; d'autres avec le bulbe conservé vingt-quatre à quarante-huit heures en glycérine; d'autres, avec le cerveau, après deux à trois mois d'immersion en glycérine. Deux animaux au moins ont été utilisés pour chaque passage.

Voici les résultats observés :

1° L'inoculation de bulbe frais donne les mêmes résultats que celle du bulbe conservé vingt-quatre à quarante-huit heures en glycérine ;

2° L'immersion du cerveau entier en glycérine et sa conservation à la glacière (+ 4°) pendant trois mois ne modifient en rien la virulence ;

3° Une série de quinze passages, répartie sur une période d'un an, du virus initial n'a produit aucun changement dans les propriétés offensives du virus ;

4° Les animaux, paralysés, dès le quatrième jour dans la majorité des cas, au plus tard le cinquième, ont succombé du sixième au huitième jour qui a suivi l'inoculation, sans avoir présenté d'autres symptômes que ceux de la rage paralytique habituelle.

D'autre part, le virus introduit par la voie sous-cutanée (2 cent. cubes d'émulsion à 1/50) n'a déterminé aucun trouble chez 2 lapins qui ont été réinoculés par la même voie avec 3 cent. cubes quatre mois plus tard, sans succès.

Ces 2 lapins ont résisté à l'inoculation intra-oculaire du virus L... deux mois après, mais ont succombé le mois suivant à une nouvelle épreuve (inoculation sous-dure-mérienne du virus du douzième passage) dans les mêmes conditions que le témoin.

AUTRES ANIMAUX. — 1° 2 cobayes qui avaient reçu sous la peau 1 cent. cube d'émulsion au 1/50 de cerveau de lapin du cinquième passage ont succombé du huitième au dixième jour après vingt-quatre à quarante-huit heures de paralysie;

2° 4 chiens vaccinés à l'École vétérinaire suivant la technique de Plantureux, six mois auparavant, ont été éprouvés par injection de virus L... dans la chambre antérieure de l'œil.

Tous ont succombé du neuvième au onzième jour qui a suivi l'inoculation après une période paralytique de vingt-quatre à quarante-huit heures et sans avoir présenté de symptômes d'excitation.

Chez un chien témoin, non vacciné, inoculé dans les mêmes conditions, la rage a évolué exactement de la même façon.

Le cas rapporté ci-dessus d'une rage humaine évoluant en moins de vingt jours, malgré le traitement, n'est certes pas exceptionnel et nous n'aurions pas songé à conserver ce virus si celui-ci ne s'était montré d'emblée aussi électif pour le lapin que le virus fixe de Pasteur, apporté en Indochine en 1890 par A. Calmette.

Le virus L... qui tue le lapin en huit jours, après vingt-quatre à trente-six heures de paralysie, nous a paru apte à suppléer le cas échéant certains virus fixes atténués par un demi-siècle de passages successifs; toutefois, son origine humaine recommande la plus grande prudence à cet égard.

On peut espérer que son agressivité pour l'homme disparaîtrait assez rapidement par une série ininterrompue de passages chez le lapin, et il est possible que le nouveau virus fixe ainsi obtenu possède des propriétés immunisantes supérieures à celles des souches utilisées pour le traitement antirabique.

Une étude prolongée de ce virus permettra sans doute de déterminer ses possibilités d'avenir. Mais, d'ores et déjà, nous

pensons, en signalant ses principaux caractères et en le mettant à la disposition des laboratoires compétents et désireux de l'étudier, répondre au désir exprimé par la Conférence internationale de la Rage (avril 1927) dans l'article suivant :

« 8. L'Organisation d'Hygiène de la Société des Nations est priée de prendre les engagements nécessaires avec un ou plusieurs instituts, pour que des recherches préliminaires soient effectuées en vue de fournir à tous les instituts antirabiques une souche de virus fixe présentant un pouvoir immunisant élevé(1). »

L'Institut Pasteur de Tanger, en raison de la personnalité de son directeur, le D^r Remlinger, qui s'est attaché depuis de nombreuses années à l'étude des problèmes touchant la rage et la vaccination antirabique, est évidemment l'un des plus qualifiés pour ces recherches préliminaires qui réclament une organisation complexe et coûteuse au service d'une compétence indiscutable.

* .

Les recherches entreprises sur ce virus indochinois renforcé nous semblent également justifiées par l'une des résolutions adoptées par la Conférence internationale de 1927, et publiée sous la forme suivante (2) :

« 6. La Conférence recommande l'exécution de recherches sur la pluralité des souches de virus des rues et de virus fixe... Elle considère que l'étude approfondie des souches de virus des rues, isolées des cas pour lesquels le traitement a échoué malgré le peu de gravité apparente des lésions, présente un intérêt tout particulier. »

D'autre part, la question de l'unité ou de la pluralité des virus rabiques ayant été mise à l'ordre du jour par un article récent de Remlinger et Bailly (3), nous avons pensé qu'il serait intéressant de confronter le virus L... avec un certain nombre de virus des rues de provenance diverse et ayant fait l'objet

(1) Ces *Annales*, 1927. Supplément publié par l'Organisation d'Hygiène de la Société des Nations, p. 8.

(2) Ces *Annales*, 1927. Supplément publié par l'Organisation d'Hygiène de la Société des Nations, p. 9.

(3) REMLINGER et BAILLY. *Bulletin de l'Académie de Médecine*, 103, séance du 2 avril 1930, p. 403.

d'une étude approfondie. N'ayant à notre disposition que des virus indochinois, nous avons envoyé une souche de virus L... au Dr Remlinger, qui a bien voulu nous faire bénéficier à cette occasion de sa grande expérience.

La conclusion des recherches pratiquées par l'éminent directeur de l'Institut Pasteur de Tanger est que le virus L... est un virus renforcé, produisant chez le lapin la rage paralytique classique à peu près dans les mêmes délais que le virus fixe (sixième au huitième jour). De tels virus ont été isolés par Remlinger, soit en Turquie, soit au Maroc.

Nous en avons nous-mêmes observé en Cochinchine de rares échantillons entre 1920 et 1925, avant de les retrouver au Tonkin où leur fréquence est certainement plus grande.

Notre observation vient à l'appui de l'opinion soutenue par Remlinger à la suite de nombreuses recherches sur des virus supposés rabiques, mais présentant certains caractères anormaux, recueillis en Europe, dans l'Afrique du Nord ou en Afrique Occidentale : le virus de la rage est *un* ; il comprend un ensemble bien homogène d'individus que ne séparent que des différences accessoires d'activité et d'agressivité, que les réactions sérologiques et l'immunité ne risquent pas de dissocier.

Cette observation et les recherches expérimentales très incomplètes qu'elle a provoquées conduisent aux remarques suivantes :

1° Une morsure légère de la base du pouce a provoqué la mort d'un Européen, à Hanoï, en moins de vingt jours, malgré le traitement antirabique suivi dans de bonnes conditions ;

2° Les symptômes assez frustes ne permettaient pas de porter un diagnostic ferme de rage, mais l'inoculation du bulbe au lapin a levé tous les doutes ;

3° Elle a permis de constater qu'il s'agissait d'un virus renforcé tuant le lapin en huit jours en moyenne, après une évolution paralytique classique ;

4° Ce virus présente donc déjà certains caractères du virus fixe et il paraît intéressant de rechercher, conformément aux indications de la Conférence de 1927, quel serait son pouvoir immunisant vis-à-vis de l'homme et des animaux ;

5° Cette observation plaide en faveur de l'unité du virus rabique et contribue à détruire la légende combattue par Remlinger et suivant laquelle dans les pays tropicaux, et parfois en Europe, certains virus rabiques présenteraient des caractères anormaux, susceptibles de leur conférer une véritable autonomie et de les mettre à l'abri du traitement pastorien ;

6° Il est possible, cependant, pour lutter contre de tels virus dont l'agressivité est considérable, que les instituts antirabiques soient amenés à utiliser un virus fixe d'origine récente (canine de préférence) et provenant peut-être de la fixation sur le lapin de l'un de ces virus de rues renforcés.

(Institut Pasteur de Hanoï.)

**LE RHUMATISME INFECTIEUX SPONTANÉ
DE LA SOURIS
PROVOQUÉ PAR LE *STREPTOBACILLUS MONILIFORMIS*,**

par C. LEVADITI, R.-F. SELBIE et M^{lle} R. SCHOEN.

Levaditi, Nicolau et Poincloux (1) ont découvert, chez l'homme, l'agent étiologique de certaines formes d'érythème polymorphe infectieux aigu accompagné de polyarthrite : le *Streptobacillus moniliformis* (14 avril 1925). En février 1926, Parker et Hudson (2) ont confirmé cette découverte à l'occasion d'une épidémie d'érythème polymorphe avec polyarthrite ayant sévi à Haverhill (Massachusetts). Le *Streptobacillus moniliformis*, dont Levaditi et ses collaborateurs ont précisé la morphologie, les caractères cultureux et la virulence, a été isolé, chez l'homme, du sang, des papules cutanées et du liquide articulaire. Ces constatations ont été relatées en 1926 et 1928 par Levaditi, Nicolau et Poincloux dans deux articles parus dans *La Presse Médicale* (3).

Or, en 1929, une observation fortuite nous a révélé l'existence, chez la souris blanche, d'une maladie spontanée caractérisée par un état septicémique, des polyarthrites et des myocardites, provoquée par le même *Streptobacillus moniliformis*. Nous avons, en effet, injecté, par voie intrapéritonéale, à quatre souris neuves, d'une part le sang, d'autre part une émulsion du névraxe d'une souris, en apparence bien portante, ayant servi à des expériences antérieures. Les deux animaux inoculés avec le sang sont restés indemnes, alors que, le douzième jour, les deux souris ayant reçu l'émulsion névraxique ont montré une polyarthrite généralisée.

(1) LEVADITI, NICOLAU et POINCLOUX. *C. R. de l'Acad. des Sc.*, **180**, 1925, p. 1188.

(2) PARKER et HUDSON. *Journ. of Pathology*, **2**, 1926, p. 357.

(3) LEVADITI, NICOLAU et POINCLOUX. *La Presse Médicale*, 1926, n° 22, du 17 mars, p. 340; LEVADITI, *ibid.*, 1928, n° 5, p. 65.

Souris 1. — Arthrite du tarse et du métatarse des membres postérieurs. Sacrifiée le douzième jour. Les cultures et l'inoculation du liquide articulaire et de la rate permettent d'isoler, à l'état pur, le *Streptobacillus moniliformis*.

Souris 2. — Polyarthrite généralisée de toutes les articulations des



FIG. 1. — *Souris 2.* Infection spontanée. Morte le vingtième jour. Polyarthrite généralisée.

membres, des articulations intervertébrales de la région dorsale et de toutes les articulations de l'appendice caudal (fig. 1 et 2). Morte le vingtième jour. Ici, également, les cultures du sang du cœur et du liquide de certaines articulations ont permis d'isoler, à l'état pur, le *Streptobacillus moniliformis*.

Il s'agissait d'une infection spontanée de la souris provoquée

par l'agent étiologique de l'érythème polymorphe arthropathique humain, et caractérisée par une septicémie et une polyarthrite généralisée. Les cultures du sang du cœur de la souris n° 2, faites en bouillon-sérum de cheval, offraient l'aspect caractéristique de l'hémoculture chez l'homme : colonies isolées, opaques, incluses dans le caillot de fibrine (fig. 3).

Ces données nous autorisaient à attribuer aux muridés, en particulier à la souris, un rôle effectif dans la transmission de l'infection à l'homme. Ces rongeurs pourraient, en effet, cons-



FIG. 2. — *Souris 2* (voy. fig. 1). Polyarthrite des articulations carpo-métacarpiennes.

tituer un réservoir de virus, la contamination de l'homme s'effectuant par la souillure des aliments au moyen de l'urine ou des matières fécales, lesquelles, d'après nos recherches, contiennent le *Streptobacillus moniliformis* (v. p. 335). Ce qui, en outre, plaide en faveur de cette hypothèse, c'est, d'abord, le fait que le malade de notre première observation, assistant du Laboratoire, avait travaillé avec des souris pendant plusieurs semaines et jusqu'à la veille de sa maladie; ensuite, cet autre fait, que l'épidémie d'Haverhill était confinée à une surface restreinte, comportant deux rues parallèles, situées le long d'une rivière. Les sujets atteints, des Lithuaniens, des Polonais et des Italiens, vivaient dans des conditions précaires. Ce sont

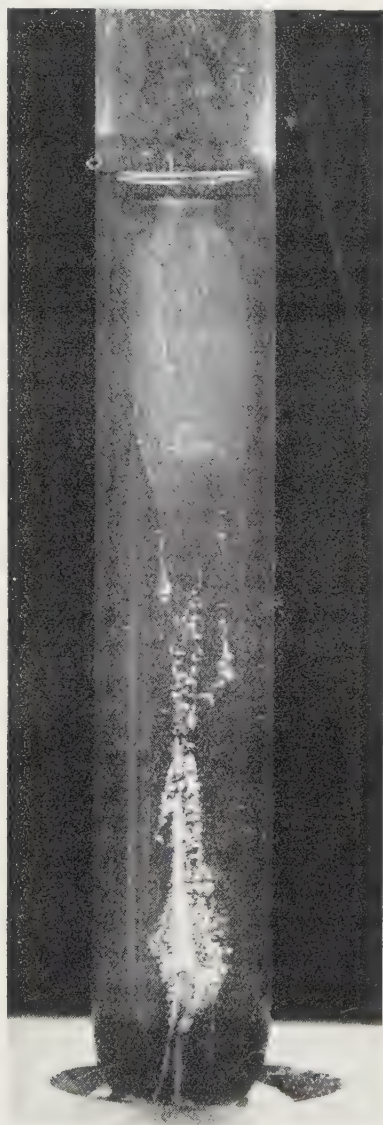


FIG. 3. — Hémoculture de *Streptobacillus moniliformis*. Souris.
Colonies dans le caillot fibrineux.

évidemment là des circonstances qui plaident en faveur de la transmission de l'infection par les muridés (1).

..

Nous avons entrepris une étude expérimentale aussi complète que possible de la polyarthrite spontanée de la souris. A notre avis, cette étude est particulièrement intéressante. En effet, au fur et à mesure que nous avançons dans nos recherches, des analogies étroites apparaissent entre la maladie de la souris et le rhumatisme polyarticulaire infectieux de l'homme. En inoculant le *Streptobacillus moniliformis* par les voies les plus diverses (sous-cutanée, intrapéritonéale, intraveineuse, intracérébrale, intraarticulaire), on reproduisait chez l'animal tous les symptômes et l'ensemble des altérations microscopiques qui caractérisent ce rhumatisme polyarticulaire infectieux humain. Nous avons réalisé : la *polyarthrite* des articulations des membres et de la colonne vertébrale, les *nodosités* sous-cutanées (érythème noueux), la *myocardite* à toutes les phases de son évolution, la *cyanose des extrémités* et de la queue (due à des troubles fonctionnels du cœur, suites de la myocardite et à des embolies microbiennes), des lésions d'*endocardite* et de *péricardite*, voire même de l'*iritis* (lapin; inoculation dans la chambre antérieure de l'œil). On saisit les possibilités qui s'offraient pour préciser, grâce à ces recherches, l'étiologie et la pathogénie des rhumatismes infectieux, d'autant plus que certaines souches de *Streptobacillus moniliformis* sont, comme nous l'avons déjà dit, virulentes pour l'espèce humaine.

La plupart des données acquises ont été résumées dans plusieurs notes parues dans les *C. R. de la Société de Biologie* (2); elles font l'objet du présent Mémoire. Nous examinerons, tour à tour, les caractères des cultures du *Streptobacillus moniliformis* isolé chez la souris, les espèces animales réceptives, les symptômes, l'évolution et l'histologie pathologique de la

(1) LEVADITI et SELBIE. *C. R. Acad. Sc.*, **189**, 1929, p. 1332.

(2) LEVADITI et SELBIE. *C. R. Soc. de Biol.*, **103**, 1930, p. 295; LEVADITI, SELBIE et R. SCHOEN. *C. R. Soc. de Biol.*, **103**, 1930, p. 463 et 1193; LEVADITI et SELBIE. *C. R. Soc. de Biol.*, **106**, 1931, p. 25.

maladie expérimentale, les voies de pénétration du virus et son élimination de l'organisme, le mode de contagion spontanée, les variations saisonnières de la virulence du microbe, enfin, quelques questions se rapportant à l'immunité.

I. — Caractères des cultures. Les variations de la virulence.

Le meilleur milieu de culture est le bouillon additionné d'un cinquième de sérum de cheval, préalablement inactivé. Le *Streptobacillus moniliformis* de la souris se développe en formant un dépôt plus ou moins abondant, constitué par des grumeaux d'aspect muqueux ; le milieu reste absolument clair. Lorsqu'on ensemence le sang du cœur, on constate l'aspect caractéristique de l'hémoculture d'origine humaine ; dans le caillot de fibrine qui flotte dans le bouillon et adhère à sa surface, apparaissent des colonies isolées, eloutées, d'une teinte blanc grisâtre, opaques (fig. 3).

Morphologiquement, nous n'avons observé aucune différence entre les souches isolées chez la souris et notre souche humaine : mêmes filaments streptobacillaires, mêmes formes en massue, en fuseau, en poire ou bipolaires, mêmes corpuscules méchromatiques colorés en rouge par le Giemsa (fig. 4). Néanmoins, il nous a semblé que les cultures actuelles se prêtaient mieux à l'étude morphologique et génétique du *Streptobacillus moniliformis*.

VITALITÉ ET VIRULENCE. — Entretienues par des ensemencements fréquents et des passages intercalaires sur la souris, nos souches de *Streptobacille* conservent longtemps leur vitalité et leur virulence. Témoins les essais suivants :

a) Dix-neuvième passage, cinquante et un jours après l'isolement. Inoculation sous-cutanée à la souris 140. Arthrite le seizième jour. Morte le 28 juin. Culture des articulations positive.

b) Vingt-ième passage, quarante-trois jours après l'isolement. Inoculation intra-veineuse à la souris 92. Arthrites généralisées, le cinquième jour. Morte le vingt-cinquième jour. Cultures positives du sang du cœur, des articulations et du foie

c) Vingt-neuvième passage, soixante et onze jours après l'isolement. Inocula-

tion sous cutanée à la souris 136. Morte le troisième jour. Cultures positives du sang du cœur, des articulations, du foie et de la rate.

Par contre, *les cultures perdent assez rapidement leur vitalité et leur virulence, si elles sont conservées à la température*



FIG. 4. — *Streptobacillus moniliformis*. Culture en bouillon-sérum. Formes bacillaires, filamenteuses, en fuseau. Coloration au Giemsa. Gross. : 4.000/1.

ambiante et surtout à 37°. C'est ce qui résulte des expériences suivantes :

1° TEMPÉRATURE AMBIANTE. — a) *Cultures conservées pendant quinze jours à la température de la chambre*. Inoculation intraarticulaire à la souris 131. Arthrite au niveau de l'injection, mais pas de généralisation. Souris morte le quatre-vingt-unième jour. Cultures négatives

b) *Cultures conservées pendant quarante-deux jours à la même température*. Inoculation sous-cutanée à la souris 128. Morte le quatre-vingt-dixième jour. Cultures négatives.

2° TEMPÉRATURE DE L'ÉTUVE. — a) Culture conservée pendant six jours à 37°, inoculée, par voie sous-cutanée, à la souris 166. Polyarthrite le huitième jour. Morte après cent sept jours. Cultures positives des articulations, du sang du cœur, du foie et de la rate.

b) Culture conservée pendant six jours à 37°, inoculée à la souris 163, par voie sous-cutanée. Morte le dix-septième jour d'infection secondaire; cultures de streptobacille : négatives.

c) Cultures conservées douze et dix-sept jours à 37°, inocuées par voie sous-cutanée aux souris 162 et 161. Résultat négatif.

Ces essais montrent que dès le sixième jour à 37°, et après quinze jours à la température ordinaire, les cultures de *Streptobacillus moniliformis* perdent leur vitalité et leur virulence.

Toutefois, même lorsqu'on a soin d'entretenir ces cultures par des passages réguliers et alternatifs sur les milieux artificiels et *in vivo*, on constate des oscillations de virulence (aptitude à provoquer des arthrites et fréquence des formes purement septicémiques). Ces oscillations paraissent offrir un caractère nettement saisonnier, comme nous le montrerons plus loin (v. p. 339).

II. — Animaux réceptifs.

1° SOURIS. — La souris blanche offre une réceptivité pour ainsi dire constante, quel que soit le mode d'inoculation choisi. Cependant, nous avons observé parfois que des animaux ayant reçu, sous la peau ou dans les veines, des quantités de cultures fraîches sûrement pathogènes, ne réagissaient en aucune manière. Ces animaux jouissaient d'un état réfractaire naturel; nous reviendrons ultérieurement sur cette question.

La souris grise sauvage paraît moins réceptive que la souris blanche. En effet, plusieurs essais de transmission par injection de cultures sous la peau, ou dans la cavité péritonéale, sont restés totalement négatifs. Néanmoins, quelques sujets ont réagi, tels les suivants :

Souris 66, inoculée par voie sous-cutanée. Absence d'arthrite. L'animal est mort le cinquième jour. Culture du sang du cœur positive.

Souris 142, inoculée par voie intraarticulaire (patte postérieure droite). Absence d'arthrite. L'animal est mort le deuxième jour. Présence de streptobacilles dans l'articulation, siège de l'injection.

Souris 143, inoculée par voie intrapéritonéale et par voie sous-cutanée (à

deux reprises). Sacrifiée treize jours après la seconde inoculation. Arthrites des articulations costo-sternales. Présence de streptobacilles dans ces articulations.

2° LAPIN. — L'étude de la virulence du *Streptobacillus moniliformis* pour le lapin nous a révélé des différences biologiques manifestes entre la souche isolée chez la souris et notre ancienne souche humaine. En effet, voici de quelle manière Levaditi, Nicolau et Poincloux résumaient, en 1926, leurs constatations au sujet de la réceptivité du lapin à l'égard du microorganisme isolé chez l'homme :

« Le lapin est le plus sensible des animaux utilisés pour l'étude de *Streptobacillus moniliformis*, quelle que soit la voie d'introduction.

Méthode de choix : inoculation intratesticulaire. L'inoculation de 1 1/2 à 2 cent. cubes de culture (hémocultures initiales, ou passages) provoque, en quarante-huit heures, une orchite typique, avec œdème scrotal. Si on sacrifie l'animal dès ce moment, on constate la propagation fréquente de l'orchite au testicule opposé et une péritonite généralisée, à flocons purulents. La rate est doublée ou triplée de volume; les poumons, les reins, le foie demeurent habituellement indemnes.

La médiastinite et la péricardite sont très fréquentes. Les frottis et les cultures de tous les organes lésés et la culture du sang du cœur mettent toujours en évidence le *Streptobacillus* typique. Si on laisse évoluer la maladie, elle se termine ordinairement par la mort de l'animal, du troisième au sixième jour. »

Or, les résultats sont différents avec la souche isolée chez les muridés. Nos expériences nous ont montré que pour cette souche c'est la souris qui est l'animal de choix, et non le lapin (1). Inoculé par les voies les plus diverses, celui-ci ne succombe jamais, même lorsqu'on s'efforce d'adapter le streptobacille par des passages répétés. Le lapin ne réagit que par des lésions locales (orchite, arthrite ou ophtalmie purulente), sans que, chez lui, la maladie se généralise et devienne mortelle. Citons quelques exemples à l'appui de ce qui vient d'être énoncé :

a) *Inoculation intraveineuse.* Lapin 84, inoculé dans les veines. Aucun trouble apparent. Sacrifié le soixante-treizième jour. Cultures négatives.

Lapins 671 H et 672 H, inoculés par voie intraveineuse et sacrifiés vingt-

(1) Nous avons essayé, sans succès, d'augmenter la virulence du Streptobacille pour le lapin, en préparant les animaux par des injections d'encre de Chine (blocage du système réticulo-endothélial).

quatre heures et cinq jours après l'inoculation. Cultures du sang positives.

b) *Inoculation intracutanée*. Lapin 89 C, reçoit, par voie intracutanée, quelques gouttes d'une culture fraîche. Il réagit par l'apparition d'un nodule au point d'inoculation, lequel se résorbe spontanément. Sacrifié le quatre-vingt-deuxième jour. Cultures négatives.

c) *Inoculation intrapéritonéale*. Lapin 639 H, inoculé par voie intrapéritonéale. Aucun trouble apparent. L'animal est sacrifié le cinquième jour. Cultures du sang du cœur et du péritoine : négatives. Chez un autre animal (640 H), inoculé de la même manière et sacrifié vingt-quatre heures après, la culture du sang du cœur et de l'exsudat péritonéal a donné un résultat positif.

d) *Inoculation par voie intrapleurale*, même résultat.

e) *Inoculation intraarticulaire*. Lapin 940 H, reçoit, par voie intraarticulaire, 0 c. c. 5 de culture fraîche. Il réagit par une arthrite, qui reste localisée. Sacrifié le vingt-neuvième jour, il ne montre aucune lésion apparente; les cultures sont stériles.

f) *Inoculation intratesticulaire*. Lapin 83 C, inoculé par voie intratesticulaire (0 c. c. 5 culture). Orchite intense. La ponction du testicule, pratiquée cinq jours après l'inoculation, fournit une culture pure de *Streptobacille*. L'animal survit et est sacrifié le soixante-quatrième jour.

g) Ajoutons que si l'*inoculation intracérébrale* reste sans effet (les lapins inoculés avec la souche humaine réagissaient par une méningo-encéphalite mortelle), par contre, l'injection de virus dans la *chambre antérieure de l'œil* est suivie d'une *ophtalmie purulente* non mortelle, précédée d'*iritis*.

3° SINGES CATARRHINIENS ET ANTHROPOIDES. — La souche streptobacillaire humaine, inoculée à des *Macacus cynomolgus*, provoquait les troubles morbides suivants : « des deux animaux utilisés, l'un, infecté par voie veineuse, fit seulement un peu de fièvre; l'autre, inoculé dans un genou, fit une arthrite avec gonflement et douleur (température 40°) » (Levaditi, Nicolau et Poincloux).

Avec la souche isolée chez les muridés, les résultats ont été, à peu de chose près, les mêmes. L'inoculation intraarticulaire a été suivie d'une arthrite localisée, sans retentissement général, alors qu'habituellement l'injection intraveineuse a été bien supportée. Toutefois, un *Macacus cynomolgus* n° 137, infecté par voie intraveineuse, intrapéritonéale et intraarticulaire, est mort après quarante-deux heures; les cultures des organes (foie, rate), du sang du cœur, de l'articulation et de l'exsudat péritonéal ont été positives. Quant au *Chimpanzé*, sa réceptivité parut nulle.

4° Plusieurs expériences ont été faites sur le *cobaye*, le *rat* blanc et le *jeune chat*. Quel que soit le mode d'infection choisi, il n'a été enregistré, chez ces animaux, qu'une arthrite localisée au point d'inoculation intraarticulaire.

En résumé, l'espèce animale la plus réceptive à l'égard de la souche de Streptobacillus moniliformis isolée chez les muridés est la souris blanche. Le lapin (sujet de choix pour la souche humaine), se révèle comme étant nettement moins sensible que la souris.

III. — Voies de pénétration du *Streptobacillus moniliformis*.

Nous avons réussi à transmettre la maladie en inoculant des cultures âgées de vingt-quatre à quarante-huit heures *sous la peau*, dans la *cavité péritonéale* et dans la *veine de la queue* de la souris. Les résultats étaient plus fréquemment positifs lorsque l'injection était pratiquée par voie intraveineuse ou intrapéritonéale; la maladie était alors souvent mortelle et sa durée se trouvait, de ce fait, abrégée. Par contre, les formes chroniques, évoluant lentement, étaient plus fréquentes chez les animaux contaminés par voie sous-cutanée ou intraarticulaire.

Quelques souris ont été inoculées dans le *cerveau*, d'autres ont été soumises à la contamination *per os*, ou par les *voies aériennes supérieures*. Voici les résultats de ces derniers essais :

a) *Inoculation intracérébrale.* Souris n° 27, inoculée dans le cerveau. Polyarthrite généralisée le dixième jour, conjonctivite. L'animal succombe le quinzième jour. Culture positive du sang du cœur, des articulations et du cerveau. L'examen histologique révèle la présence de lésions de myocardite (absence d'altérations d'encéphalite).

b) *Essai de contamination per os.* Souris 21, reçoit, par voie buccale, à 8 reprises, des cultures fraîches de Streptobacille. Elle ne paraît pas malade. Inoculée par voie sous-cutanée, trente-quatre jours après la dernière injection, elle succombe le troisième jour; présence du Streptobacille dans le sang du cœur, les organes et les articulations.

c) *Voie nasale.* Souris 47. On lui instille dans le nez une goutte de culture fraîche, à 9 reprises consécutives. L'animal survit cent quatre-vingt-dix-neuf jours sans montrer des troubles apparents. Eprouvé par voie sous-cutanée, il se montre réceptif.

Ajoutons que les tentatives de transmission par inoculation de virus *sur la peau* épilée et scarifiée et dans le *globe oculaire* se sont révélées infructueuses.

Il en résulte que le *Streptobacillus moniliformis* est pathogène pour la souris blanche lorsqu'on l'administre sous la peau, dans

le péritoine, dans la circulation sanguine, dans le cerveau ou dans les articulations. Par contre, il paraît inoffensif quand on l'introduit dans le tube digestif, dans les narines, dans le globe oculaire, ou quand on le dépose sur la peau, préalablement scarifiée.

VITESSE DE PÉNÉTRATION. — Il nous a semblé intéressant de préciser la vitesse de pénétration du *Streptobacille* dans l'organisme de la souris. Pour résoudre ce problème, nous avons inoculé nos cultures sous la peau de l'extrémité de la queue, puis nous avons sectionné cette queue cinq minutes et une demi-heure après l'inoculation. Deux animaux, ayant servi à cette expérience, sont morts l'un le cinquième jour, l'autre le dixième jour, avec présence de *Streptobacilles* dans le sang, les organes et les articulations atteintes de polyarthrite généralisée. Cet essai montre que *le Streptobacillus moniliformis envahit rapidement l'organisme, lorsqu'il est injecté sous la peau de la queue de la souris* (importance des blessures dans la transmission spontanée de la maladie; voy. page 337).

IV. — Symptômes et altérations histopathologiques de la maladie expérimentale.

Deux principales manifestations morbides caractérisent la maladie provoquée chez la souris par le *Streptobacillus moniliformis*: la *polyarthrite* et la *myocardite*, dues à la localisation du microbe dans les articulations ou le myocarde, et aux lésions qu'il y détermine. Ces manifestations sont précédées par un *état septicémique*, lequel peut déterminer la mort avant que l'on puisse constater l'éclosion d'altérations articulaires ou myocardiques. Nous les examinerons en détail, en insistant sur les relations qui les rattachent aux manifestations analogues observées en pathologie humaine.

1° LES POLYARTHrites (1).

66 souris ont servi à nos expériences. Le matériel d'inoculation a été, soit des produits provenant d'animaux infectés

(1) LEVADITI, SELBIE et SCHOEN. *C. R. Soc. de Biol.*, 1930, p. 1193.

spontanément ou inoculés avec le *Streptobacillus moniliformis*, soit des cultures fraîches (vingt-quatre heures) de ce microorganisme. Les voies d'inoculation ont été des plus variées. Ainsi, dans la première série de 24 animaux, nous avons pratiqué 20 inoculations intrapéritonéales et 4 inoculations intraarticulaires. Dans la seconde série de 42 souris (cultures), nous avons réalisé 19 inoculations sous-cutanées, 10 intracérébrales, 5 intraveineuses, 4 intrapéritonéales, 3 intraarticulaires et une intradermique (face plantaire du membre postérieur). L'incidence des arthrites a varié suivant le matériel utilisé et la voie choisie pour l'inoculation. Le tableau ci-joint résume l'ensemble des résultats obtenus.

TABLEAU I.

SÉRIE I. — *Inoculation de matériaux virulents.*

SOURCE DU VIRUS	NOMBRE d'animaux	ARTHRITES	DATE de l'apparition des arthrites (en jours)	INFECTION positive
—	—	—	—	—
Inoculation intrapéritonéale :				
Sang.	4	1	6	2
Foie	2	0	—	0
Rate.	3	0	—	1
Cerveau	6	1	14	2
Pus articulaire.	5	0	—	3
Inoculation intraarticulaire :				
Articulation triturée, ou pus				
articulaire	4	4	5, 6 et 9	4

SÉRIE II. — *Inoculation de cultures.*

VOIE d'inoculation	NOMBRE d'animaux	ARTHRITES		DATE de l'apparition des arthrites (en jours)	INFECTION positive
—	—	—	p. 100	—	—
Sous-cutanée . . .	19	13	68	3- 7	15
Intracérébrale . . .	10	3	30	6-10	5
Intraveineuse . . .	5	5	100	3- 5	5
Intrapéritonéale . .	4	1	25	6	3
Intraarticulaire . .	3	3	100	6- 8	3
Intradermique . . .	1	1		9	1

Il résulte de ces données que la fréquence des arthrites est plus marquée lorsqu'on se sert de cultures de *Streptobacillus moniliformis* comme matériel d'inoculation, que si l'on s'adresse

à du sang ou à des émulsions d'organes de souris infectées (60 p. 100 au lieu de 10 p. 100). Par ailleurs, le mode d'inoculation influe manifestement sur l'incidence de ces arthrites. Ainsi, pour la série d'animaux infectés avec des cultures, on constate que les inoculations intraveineuses et intraarticulaires

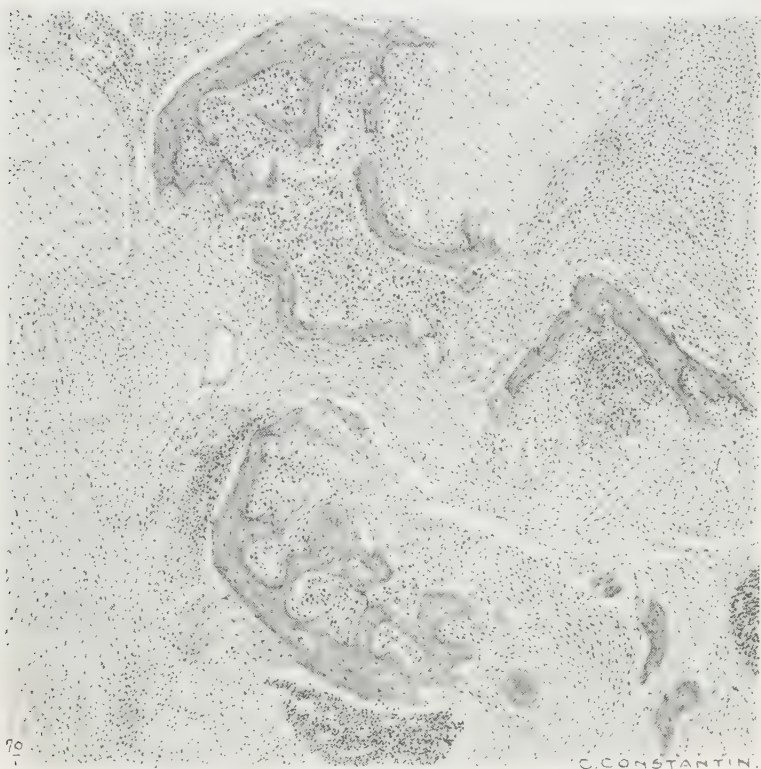


FIG. 5. — *Souris 2. Infection spontanée.* Morte le vingtième jour. Articulation tibio-tarsienne. Arthrite généralisée. Fragmentation du tissu cartilagineux. Inflammation monocytaire et polynucléaire de la synoviale. Hémalum. Gross. : 70/1.

fournissent le pourcentage de succès le plus élevé (100 p. 100) ; viennent ensuite, par ordre décroissant, les inoculations sous-cutanées (68 p. 100), intracérébrales (30 p. 100) et intrapéritonéales (25 p. 100). Quoi qu'il en soit, on doit conclure de ces recherches que les arthrites généralisées surviennent chez les souris inoculées avec le *Streptobacillus moniliformis*, quelle que

soit la voie choisie pour l'inoculation du virus, à la condition que cette inoculation ait été suivie d'infection. Toutefois, dans quelques rares cas, la septicémie se déclare sans qu'il y ait apparition d'arthrites (inoculation intrapéritonéale, intracérébrale et sous-cutanée; voir le tableau ci-dessus).

Etude histopathologique des arthrites. — Il y a lieu de

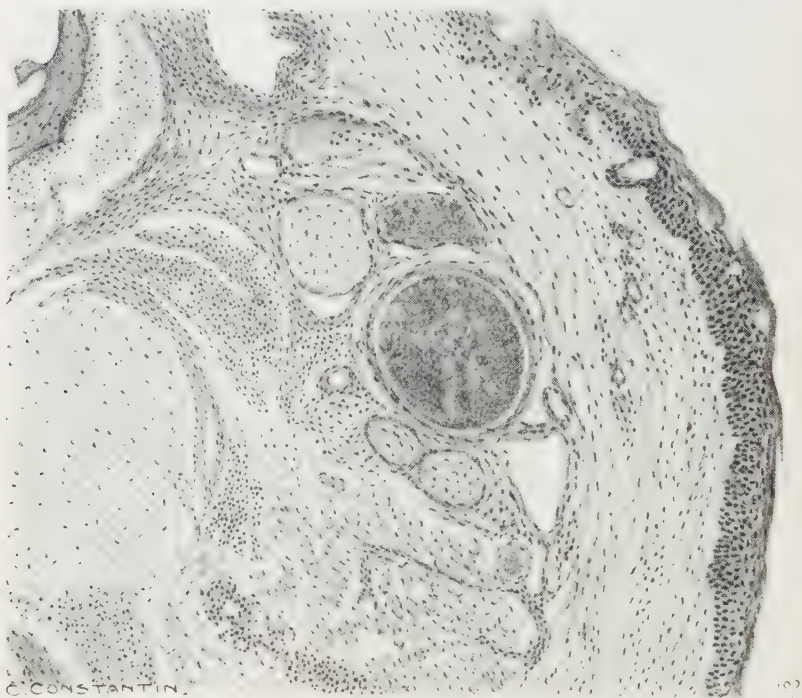


FIG. 6. — *Souris 13.* Inoculation intrapéritonéale. Morte le dix-septième jour. Arthrite de l'articulation tibio-tarsienne. Infiltration du tissu musculaire et des troncs nerveux par des monocytes et des polynucléaires. Mann. Gross. : 100/1.

distinguer deux phases dans l'évolution des arthrites, quelle que soit leur localisation (tarso-métatarsienne, genou, maxillaire inférieur, vertèbres, etc.) : une *phase aiguë* et une *phase chronique*.

a) *Phase aiguë.* — La synovie est le siège d'une inflammation intense, constituée, en général, par des polynucléaires à noyaux caryolysés et par de rares lymphocytes. Un réseau de

fibrine emprisonne ces polynucléaires. Les éléments cellulaires de la synovie sont en état de prolifération (fig. 5). Cette syno-

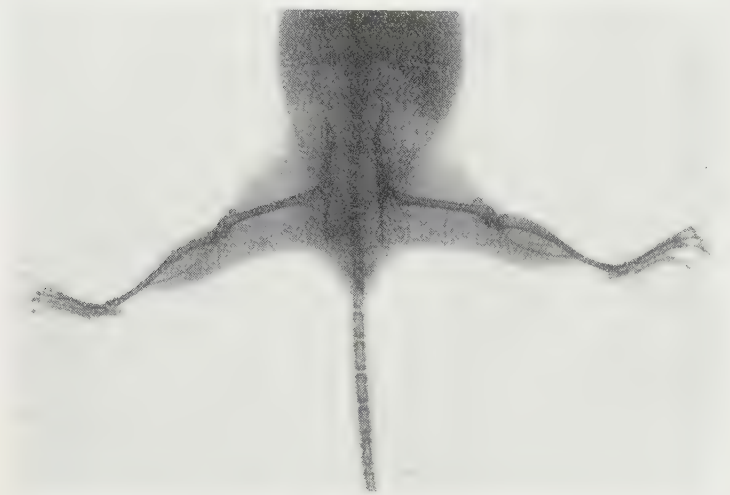


FIG. 7. — *Souris normale*. Image radiographique.

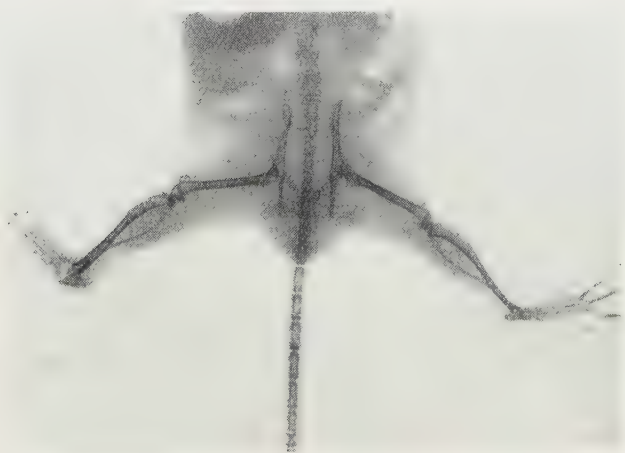


FIG. 8. — *Souris 2 bis*. Infection spontanée. Image radiographique.
Altérations de l'articulation tibio-tarsienne gauche.

vite aiguë se propage fréquemment aux tissus environnants. Dans les cas les plus avancés, on constate, en effet, une infil-

tration des gaines tendineuses, des petits faisceaux musculaires et même de certains nerfs périphériques, dans leur trajet péri-articulaire (fig. 6). Ça et là, on observe des thromboses vasculaires. Quoi qu'il en soit, les méthodes de coloration appropriées, en particulier l'imprégnation argentique (1), permettent

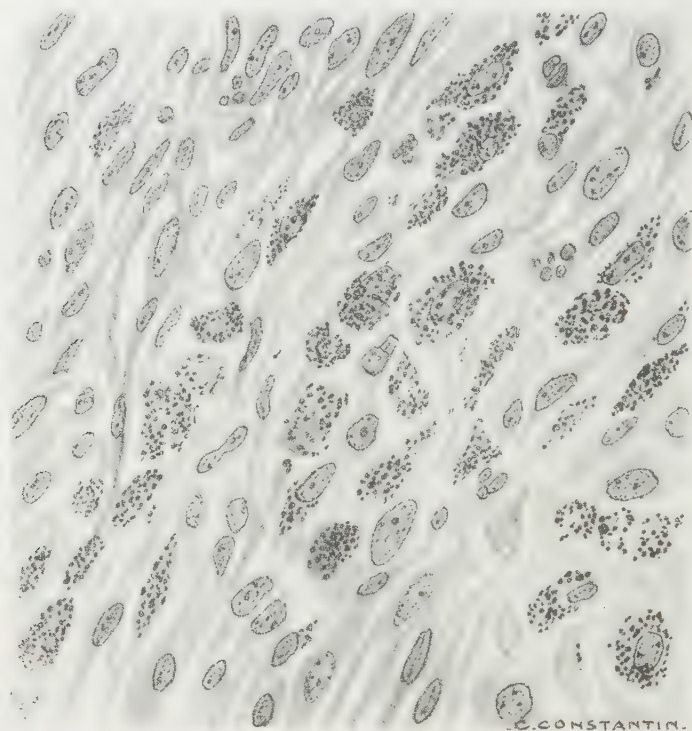


FIG. 9. — *Souris 1*, Infection spontanée. Sacrifiée le treizième jour. Articulation. Histiocytes contenant des formes involutives du *Streptobacillus moniliformis*. Imprégnation à l'argent. Gross. : 800/1.

de déceler, au milieu des foyers inflammatoires et dans les vaisseaux thrombosés, le *Streptobacillus moniliformis*; celui-ci revêt tous les aspects connus : petits bacilles, formes filamenteuses, formes pseudo-spirillaires, massues, etc.

b) *Phase chronique*. — Au delà du treizième-vingtième jour, l'arthrite, devenue chronique et déformante, offre les altéra-

(1) Méthode de Levaditi.

tions suivantes : quelques restes des foyers inflammatoires aigus à polynucléaires persistent encore, mais ils sont englobés dans un tissu cicatriciel et néoformatif. Une véritable coque, constituée par des fibroblastes, des monocytes et des gros mononucléaires vacuolisés, emprisonne ces anciens foyers. Par ailleurs, le tissu cartilagineux prolifère, et il en est de même du périoste. Celui-ci donne naissance à des bourgeons qui sillonnent la cavité articulaire, alors que d'autres bourgeons sont formés par des cellules cartilagineuses. De véritables adhérences intra-articulaires réunissent les divers éléments synoviaux, osseux et cartilagineux, d'où la déformation constatée cliniquement dans ces formes d'arthrite chronique (1). Le streptobacille est toujours présent, ainsi qu'en témoignent les cultures positives, de même que l'existence de formes involutives, surtout dans le cytoplasme des gros mononucléaires (fig. 9).

Conclusions. — *Le Streptobacillus moniliformis provoque, chez la souris, des polyarthrites aiguës ou chroniques, le plus souvent généralisées, et apparaissant après l'inoculation des cultures sous la peau, dans les veines, dans le cerveau ou dans l'articulation. Les altérations microscopiques constatées ne diffèrent pas de celles que l'on observe dans les arthrites infectieuses aiguës ou chroniques de l'homme.*

2° LES ENDO-MYOCARDITES (2).

Parmi les analogies entre la streptobacillose des muridés et certains rhumatismes infectieux humains, la fréquence des myocardites est à signaler, au même titre que celle des arthrites. C'est à la description de ces myocardites que nous désirons consacrer le présent paragraphe.

FRÉQUENCE DES MYOCARDITES ET CONDITIONS OU ELLES APPARAISSENT.

— Plus de 50 examens microscopiques du cœur ont été pratiqués; ils ont révélé la présence de lésions myocardiques dans 73 p. 100 des cas. *Les myocardites streptobacillaires sont donc*

(1) Ces déformations apparaissent assez nettement sur les clichés radiographiques (fig. 7 et 8).

(2) LEVADITI, SELBIE et SCHOEN. *C. R. Soc. de Biol.*, **103**, 1930, p. 463.

d'une fréquence extrême. Elles apparaissent aussi bien chez les souris inoculées avec le névraxe, le sang ou le liquide articulaire d'autres animaux infectés spontanément ou expérimentalement, que chez les muridés inoculés avec des cultures. Le mode d'inoculation ne semble pas jouer un rôle important, les altérations myocardiques existant indifféremment chez des souris à streptobacillose spontanée, ou infectées par voie intra-

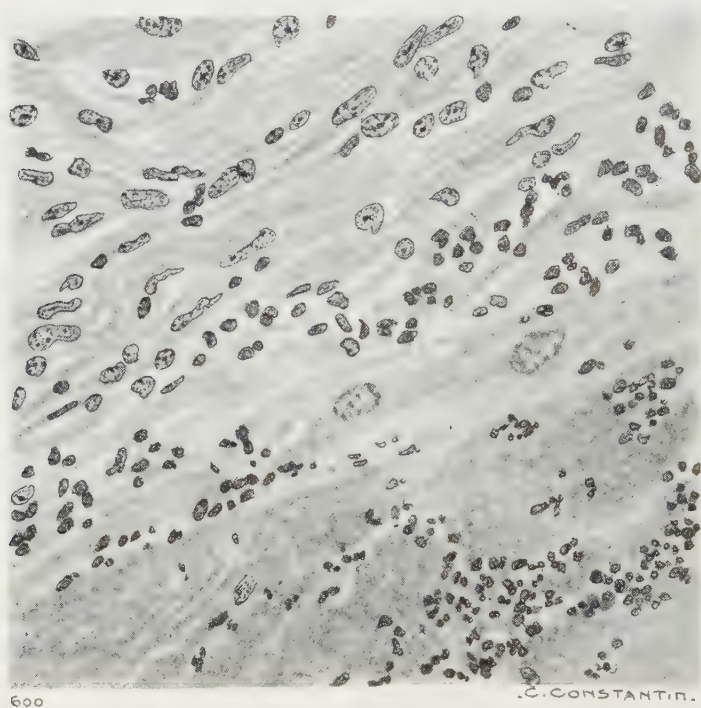


Fig. 10. — *Souris* 13 (voy. fig. 12). Foyer de myocardite. Nécrobiose des myocytes et infiltration par des polynucléaires caryolysés. Hémalum. Gross. : 600/1.

péritonéale, sous-cutanée, intraarticulaire ou intracérébrale. Elles peuvent être précoces (souris mortes du quatrième au cinquième jour), ou tardives (animaux sacrifiés ou ayant succombé du quinzième au vingtième jour). Dans tous les cas, l'examen bactériologique met en évidence la présence du *Streptobacillus moniliformis* dans le sang, le pus articulaire et la plupart des organes (foie, rate, cerveau, rein).

Etude histopathologique des nodules myocardiques. — Fréquemment la myocardite streptobacillaire se traduit macroscopiquement par des taches blanc grisâtre ou jaunâtres, intéressant soit l'apex, soit les faces antérieures ou postérieures du myocarde. Microscopiquement, il y a lieu de distinguer les lésions des fibres musculaires, du tissu conjonctif et des vaisseaux.

Fibres musculaires. — Les fibres cardiaques situées au centre



FIG. 11. — *Souris* 40. Inoculation intraarticulaire. Morte le dix-septième jour. Myocardite aiguë inflammatoire et dégénérative. Hémalun. Gross. : 90/1.

des foyers myocardiques sont profondément altérées. Leur striation transversale est effacée, les noyaux du sarcolème ont perdu toute affinité colorante; la plupart d'entre elles sont atteintes de dégénérescence vitreuse ou hyaline (fig. 40). A la périphérie, on assiste, au contraire, à des phénomènes réactionnels, se traduisant par une hypertrophie des noyaux, voire même par une prolifération nucléaire indiquant une certaine tendance à la régénérescence des fibres cardiaques.

Tissu interstitiel. — Les altérations des travées conjonctives sont, à la fois, transsudatives et diapédétiques : d'une part, transsudation séro-fibrineuse et œdème de ces travées, d'autre part diapédèse polynucléaire intense, avec caryolyse des noyaux (fig. 11). Lorsque la lésion revêt une allure subaiguë, on constate, à la périphérie du nodule, une accumulation de lymphocytes et de monocytes à noyaux lobés (fig. 12).

Système vasculaire. — Les vaisseaux, tout particulièrement

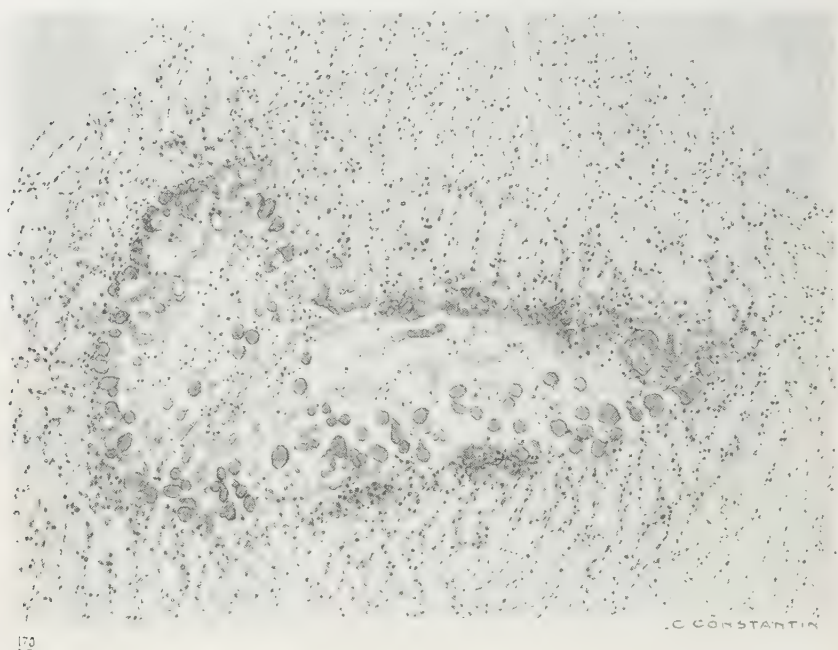


FIG. 12. — *Souris* 13. Inoculation intrapéritonéale. Morte le dix septième jour. Foyer de myocardite. Dégénérescence hyaline des fibres musculaires du myocarde. Unna. Gross. : 470/1.

les artérioles, sont atteints de thrombose et de lésions destructives intéressant leurs parois. La lumière vasculaire est obstruée par des caillots fibrino-leucocytaires, l'*intima* montre des solutions de continuité, la tunique moyenne et les travées élastiques sont partiellement détruites. Le vaisseau est entouré de leucocytes à noyaux polymorphes et de petits foyers hémorragiques.

Topographie, genèse et évolution. — Les nodules myocar-

diques ont pour siège l'apex, le cœur gauche et surtout les piliers valvulaires. Rarement, on en rencontre au niveau des oreillettes. Voici comment on doit envisager leur genèse : au début, et dans les formes suraiguës, ce qui prédomine ce sont les embolies microbiennes intracapillaires, au contact même des fibres musculaires (fig. 13). Le *Streptobacillus moniliformis* pullule tout contre la paroi endothéliale de ces capillaires

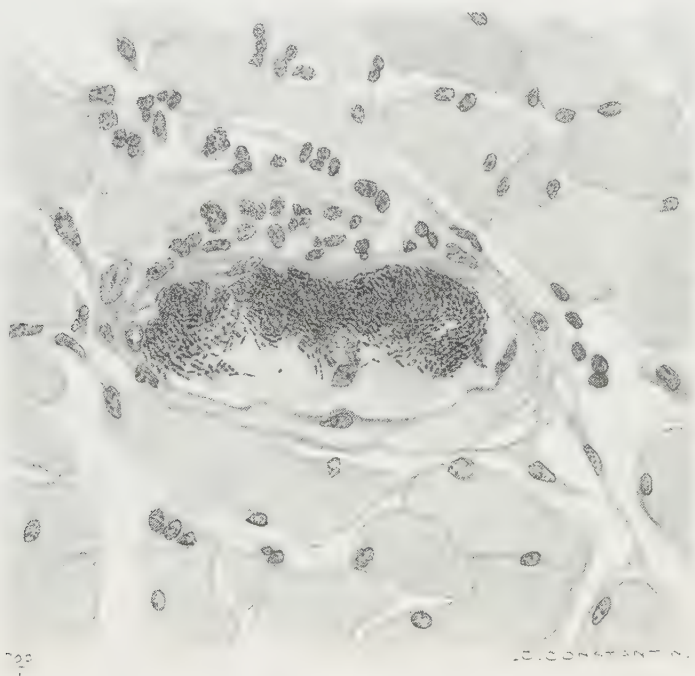


FIG. 13. — *Souris* 17. Inoculation intraarticulaire. Morte le neuvième jour. Myocarde. Embolie microbienne intravasculaire. Infiltration par des polynucléaires. Unna. Gross. : 700/1.

(imprégnation à l'argent) [1]. Ultérieurement, on constate des thrombus microbiens, soit dans les mêmes capillaires, soit dans les petits vaisseaux. Puis, on assiste à la contamination bactérienne du tissu conjonctif interstitiel et des fibres cardiaques. Le germe pénètre alors dans le sarcoplasme de ces fibres, y

(1) Ce fait implique une affinité élective du *Streptobacillus moniliformis* pour les endothéliums des capillaires myocardiques.

pullule et forme de véritables kystes microbiens intramusculaires (fig. 14).

Du point de vue cytologique, la myocardite streptobacillaire évolue en deux phases : une première phase aiguë, exsudative et dispédétique, accompagnée de dégénérescence hyaline et vitreuse des fibres myocardiques, et une seconde phase réactionnelle, éminemment monocytaire et proliférative (fig. 15).

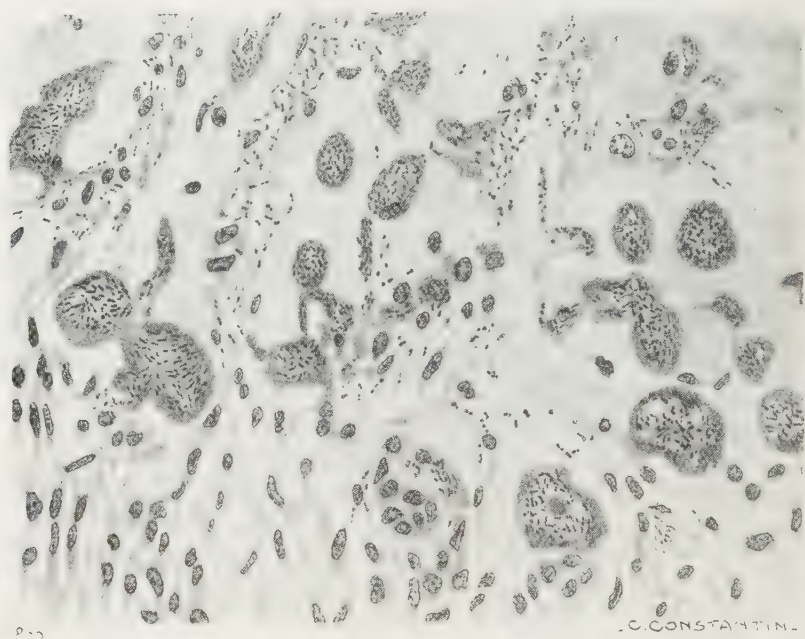


FIG. 14. — *Souris 13* (voy. fig. 12). Pénétration du *Streptobacille* dans les fibres musculaires et tendance à l'enkystement. Unna. Gross. : 800/1.

Parfois ces deux phases se rencontrent simultanément dans le même myocarde.

RÉSUMÉ. — Il s'agit, en somme, d'une *myocardite aiguë ou subaiguë*, provoquée par le *Streptobacillus moniliformis*, complication fréquente de la *polyarthrite infectieuse de la souris*. Cette myocardite est à rapprocher des myocardites infectieuses de l'homme, en particulier des myocardites typhique et rhumatismale aiguë. La ressemblance avec ces types d'altérations

myocardiques humaines réside, d'abord, dans le mécanisme de leur genèse. Si, chez l'homme, « il faut envisager les différentes altérations anatomo-pathologiques comme des modalités d'un même processus frappant, à des degrés variables et suivant une évolution irrégulière, le tissu musculaire et l'élément conjonctivo-vasculaire » [Laubry et Walser (1)], il n'en

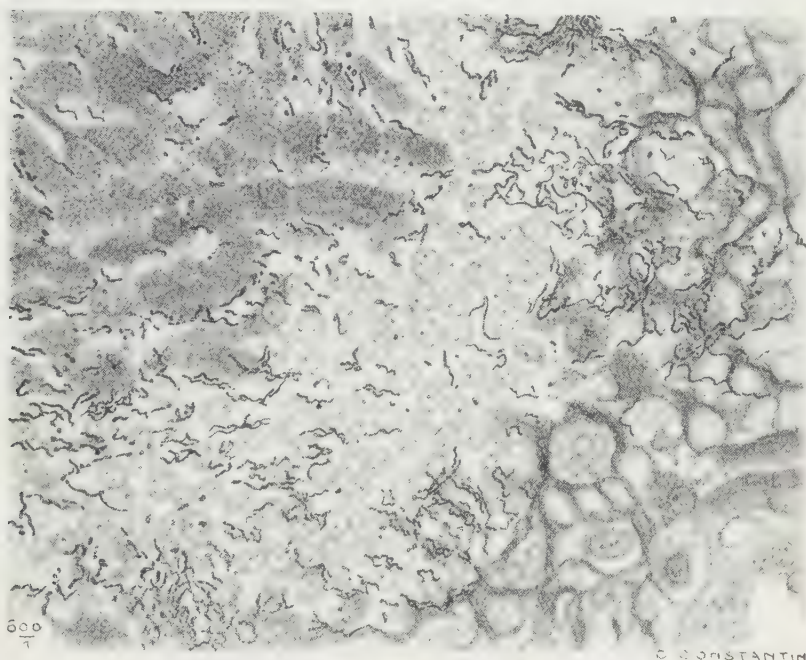


FIG. 15. — *Souris* 55. Inoculation intracérébrale. Morte le quatorzième jour. Foyer de myocardite chronique monocyttaire. Streptobacilles (formes filamenteuses et pseudo-spirillaires) dans le foyer myocardique et entre les fibres musculaires. Imprégnation à l'argent. Gross. : 600/1.

est pas autrement chez la souris. Ensuite, la même ressemblance apparaît, si l'on compare certains de nos foyers myocardiques, aux nodules rhumatismaux d'Aschoff et Tawara (2), si bien étudiés en France par Letulle, Bezançon et M.-P. Weil (3) :

(1) LAUBRY et WALSER. *Nouveau Traité de pathologie interne*, 3, 1930, p. 557.

(2) ASCHOFF et TAWARA. *Die heutige Lehre von dem pathol.-anat. Grundlagen der Herzenschwäche*. Iéna, 1906.

(3) LETULLE, BEZANÇON et M.-P. WEIL. *Annales de Médecine*, 19, 1926, p. 117.

même disposition en îlots, même topographie périvasculaire, même structure cytologique, surtout lorsqu'il s'agit de foyers ayant évolué d'une manière suraiguë chez la souris.

ENDOCARDITE. — Ces altérations myocardiques s'accompagnent, assez fréquemment, de lésions de l'endocarde et du

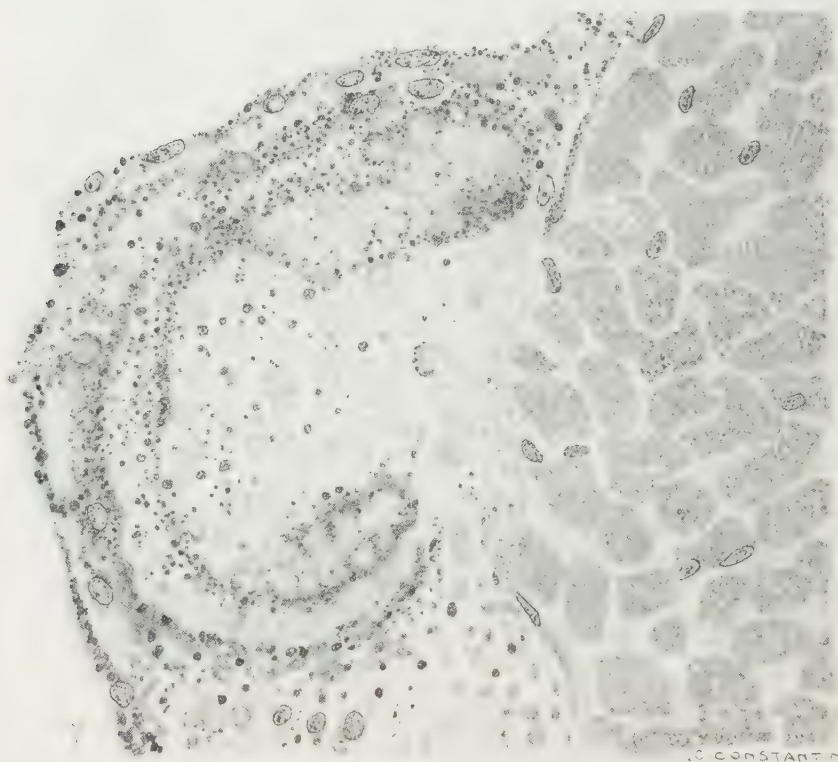


FIG. 16. — *Souris* 3. Inoculation intraveineuse. Morte le cinquième jour. Petit foyer d'endocardite végétante. Imprégnation argentique. Gross. : 700/1.

péricarde. Il s'agit de petits foyers inflammatoires, dont la constitution cytologique varie suivant l'évolution aiguë ou chronique du processus infectieux. Les polynucléaires, dans les formes rapides, les mononucléaires, dans le type à marche plus lente, forment des nodules qui envahissent les piliers ventriculaires, se dirigeant vers les insertions des valvules. Il se produit, de la sorte, de petites végétations microscopiques,

lesquelles proéminent à la surface de l'endocarde et engendrent une desquamation des endothéliums. Ça et là, on constate des minuscules solutions de continuité (ulcérations endocardiques) [fig. 16].

La PÉRICARDITE, plus rare, se traduit par une exsudation séro-fibrineuse et une diapédèse des polynucléaires, contenant des

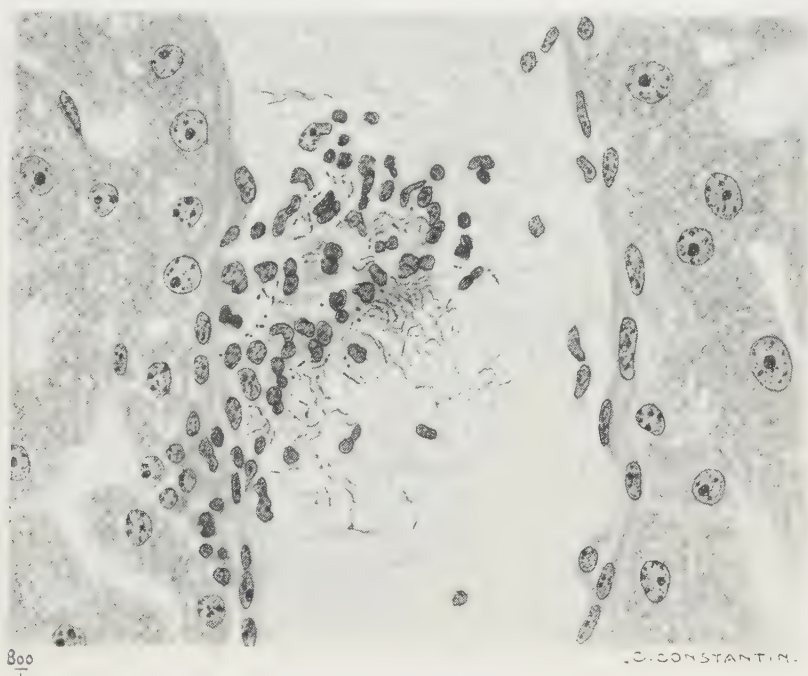


FIG. 17. — *Souris 20. Inoculation intrapéritonéale. Morte après vingt-quatre heures. Pullulation du Streptobacille dans un vaisseau hépatique au contact des leucocytes. Unna. Gross. : 800/1.*

streptobacilles ; ceux-ci peuvent être mis en évidence par l'examen direct, ou par culture.

Parfois, il nous a été donné d'observer une *cyanose des extrémités et de la queue*, témoin l'expérience suivante :

Souris 61, inoculée par voie sous-cutanée. Le quatrième jour, on constate une cyanose de la queue et des quatre extrémités, de la conjonctivite et des hémorragies nasales. Morte le cinquième jour. A la nécropsie, on observe des foyers multiples de myocardite. Les cultures du sang du cœur et des

organes sont positives. L'examen histologique révèle des altérations de myocarde diffuse (avec présence du *Streptobacillus moniliformis*) et d'arthrite aiguë. L'inflammation du tissu conjonctif péri-articulaire se propage dans les gaines tendineuses et dans les muscles, où l'on constate des lésions de myosite et des embolies microbiennes.

Cette expérience et les données microscopiques qu'elle comporte prouvent que *la cyanose des extrémités et de la queue est attribuable aux altérations du myocarde et aux embolies capillaires du tissu conjonctif sous-cutané* (1).

Les lésions constatées chez le *lapin* n'offrent rien de caractéristique. L'ORCHITE provoquée par l'inoculation du virus dans le testicule est constituée, au centre, par une accumulation de polynucléaires, en grande partie caryolysés et, à la périphérie, par des monocytes à disposition périvasculaire. Ce processus inflammatoire déclenche un arrêt de la spermatogénèse.

V. — Conservation du *Streptobacillus moniliformis* chez les souris atteintes d'arthrite infectieuse (microbisme latent).

Au cours de nos expériences, nous avons été frappés par la chronicité de la maladie streptobacillaire expérimentale, et par la longue durée de conservation du *Streptobacillus moniliformis* dans l'organisme de la souris. Le rhumatisme infectieux spontané des muridés peut donc revêtir l'aspect d'un véritable *rhumatisme chronique déformant*, dont la ressemblance avec certaines affections articulaires humaines est des plus saisissantes. L'analogie est d'autant plus évidente que la maladie de la souris peut *récidiver*, des attaques aiguës pouvant succéder à des périodes où le processus offre une allure chronique, pour ainsi dire stabilisée. Voici quelques expériences venant à l'appui de ces affirmations :

Souris 41, inoculée dans l'articulation tarsienne droite postérieure, avec du liquide articulaire virulent provenant de la *souris 18*. Arthrites généralisées le quatrième jour. Ces arthrites s'accompagnent d'alopecie de la tête. Elles persistent le quatre-vingt-deuxième jour, date de la mort de l'animal.

(1) Nous avons constaté chez certaines de nos souris des alopecies de la tête (*souris 41*, p. 334).

L'examen histologique révèle des lésions de myocardite, de néphrite interstitielle et de polyarthrite. Les altérations articulaires ont un caractère chronique; elles sont riches en fibroblastes et contiennent des *Streptobacilles déformés*. Les cultures de l'articulation sont positives.

Souris 166, inoculée par voie *sous-cutanée* avec une culture vieille de dix jours. Polyarthrite ayant débuté le septième jour. Morte le cent septième jour. Cultures positives du sang du cœur, des articulations, du foie et de la rate.

Souris 75, inoculée par voie *intraveineuse*, avec une culture streptobacillaire fraîche. Polyarthrites ayant débuté le cinquième jour. Ces polyarthrites sont suivies de déformations articulaires, lesquelles finissent par guérir. L'animal meurt le cent quatre-vingt-neuvième jour. Les cultures du sang du cœur, du foie et de la rate sont positives.

Ces expériences prouvent que *même cent quatre-vingt-neuf jours après l'inoculation le Streptobacillus moniliformis peut être présent dans l'organisme de souris atteintes de polyarthrite infectieuse*. Les cultures le révèlent dans le sang du cœur, les organes et les articulations. L'examen microscopique montre que le microbe peut revêtir l'aspect de germes déformés, granuleux, la plupart inclus dans les macrophages (principalement au niveau des articulations). Il s'agit de *formes de résistance* (fig. 9), capables d'assurer la vie latente du virus, lequel, pour des raisons qui nous échappent, peut entrer brusquement dans une phase de pullulation active. Des poussées septicémiques s'ensuivent, occasionnant la mort de l'animal, généralement par myocardite aiguë, ce qui constitue une analogie de plus entre la maladie expérimentale et le rhumatisme infectieux humain (rhumatisme polyarticulaire, type Bouillaud).

VI. — Élimination du *Streptobacillus moniliformis* par l'urine. Mode de contamination.

Afin de préciser le mode de propagation spontanée de la polyarthrite streptobacillaire, nous avons étudié l'élimination du *Streptobacillus moniliformis* par l'urine chez les souris en proie à une infection aiguë. Ces essais nous ont montré qu'il est parfois possible de déceler ce microorganisme dans l'urine, soit par examen direct, soit au moyen de cultures. Toutefois, le problème est rendu complexe du fait des associations microbiennes qui, dans l'urine, peuvent masquer la présence du

streptobacille. Voici, cependant, une expérience nous ayant fourni des résultats nettement démonstratifs :

Souris 59, inoculée avec une culture fraîche, par voie intraveineuse. Arthrites généralisées le quatrième jour. Malade le dixième jour, elle est sacrifiée. Cultures pures du sang du cœur et de tous les organes. L'urine, recueillie par ponction vésicale, fournit une culture pure et typique de *Streptobacille* (aspect fusiforme). Cette culture est inoculée aux *souris 81 et 82*, lesquelles réagissent par des polyarthrites généralisées et meurent, la première le cinquante-quatrième jour (arthrite déformante, culture positive de la rate), la seconde le dix-septième jour (culture positive de l'articulation malade).

Le Streptobacillus moniliformis peut donc s'éliminer par l'urine. Cette constatation nous a permis de préciser le mode de contamination spontanée de la maladie chez les muridés.

MODE DE CONTAMINATION DE LA POLYARTHRITE INFECTIEUSE CHEZ LA SOURIS [EN COLLABORATION AVEC M. DELORME (1)].

Le mode de transmission spontanée du rhumatisme polyarticulaire infectieux de la souris a été précisé par les expériences suivantes :

Expériences : 4 souris : 243 A, 244 A, 246 A et 279, mises en cohabitation, à l'obscurité, avec des souris présentant des polyarthrites, sont mortes respectivement après trente-cinq, vingt-sept, vingt-neuf et neuf jours, les deux premières avec des symptômes de polyarthrite, les deux dernières sans lésions articulaires. Chez ces 4 souris, l'hémoculture a confirmé ou révélé l'invasion de l'organisme par le *Streptobacillus moniliformis*.

Protocole : A) Le 21 janvier 1931, les souris 243 A et 244 A sont placées dans une chambre obscure, dans le même bocal que les souris 243, 244, 245 et 246. Le 3 février, celles-ci sont inoculées avec le streptobacille et meurent d'infection streptobacillaire les 12 février, 26 mars, 20 février et 16 mars.

Observation de la souris 243 A, contaminée spontanément. — Le 26 février : premiers symptômes de polyarthrite. 9 mars : arthrite du carpe droit et des deux tarses, avec symptômes d'infection générale. 10 mars : mort. Hémoculture et culture du pus articulaire : positives.

Observation de la souris 244 A (idem). — 26 février : premiers symptômes de polyarthrite. 2 mars : polyarthrite des deux carpes et des deux tarses. Mort. Hémoculture, culture du pus articulaire et culture de la pulpe splénique : positives.

B) Le 27 février, on place dans le même bocal, contenant encore les souris 244, 246, 243 A et 244 A, les souris 245 A et 246 A.

A la date du 15 mai, la souris 245 A ne présente aucun symptôme d'infection streptobacillaire.

(1) LEVADITI, SELBIE et DELORME. *C. R. Soc. de Biol.*, 107, 1931, p. 501.

Observation de la souris 246 A, contaminée spontanément. — 25 mars : symptômes d'infection générale, sans localisations articulaires. 28 mars : mort. L'hémoculture renferme le *Streptobacille*.

C) Le 10 mars, dans le bocal contenant les souris 244, 245 A, 246 A encore indemnes, et les souris 246 et 243 A, atteintes de polyarthrite, on place les souris 279 et 280.

Observation de la souris 279, contaminée spontanément. — Pas de polyarthrite ; morte le 19 mars, avec des symptômes d'infection générale. L'hémoculture et la culture de pulpe splénique renferment le *Streptobacille*.

Ces observations montrent que *le rhumatisme infectieux polyarticulaire de la souris peut se transmettre d'animal malade à animal sain, par simple cohabitation dans le même bocal, à l'obscurité* (1). La maladie contractée par contact se traduit soit par des polyarthrites multiples, soit par la forme septicémique streptobacillaire. L'incubation a été de neuf et de vingt-six jours (forme septicémique), et de vingt-trois jours (forme polyarthritique).

De quelle manière cette transmission s'opère-t-elle ? Les faits suivants paraissent démontrer la possibilité d'au moins deux modes de contamination : par *morsure* et par *souillure avec de l'urine*, laquelle, comme nous l'avons déjà montré antérieurement (voy. page 335), peut, chez les animaux malades, contenir le *Streptobacillus moniliformis*. En effet, d'une part, nous avons relevé chez une souris 321, morte trois jours après l'inoculation, par voie sous-cutanée, d'une culture de *Streptobacilles* (inoculation immédiatement suivie d'une immersion de trois minutes dans l'eau froide), des symptômes et des lésions d'ictère et de néphrite avec hémoglobinurie. L'urine de cette souris a fourni en bouillon-sérum une culture pure de *Streptobacille*, lequel s'est montré très virulent. En effet, des 4 souris inoculées avec cette culture, le 7 mai, l'une est morte de septicémie en six jours, 2 souris ont présenté, dans le même délai, des symptômes de polyarthrite, et la quatrième était encore indemne neuf jours après l'inoculation.

D'autre part, la souris 281, placée dans un bocal contenant deux souris atteintes de polyarthrite streptobacillaire, a présenté, après quarante-huit jours de cohabitation, un *abcès* dans

(1) Des expériences effectuées parallèlement aux précédentes, avec des souris exposées à la lumière naturelle, n'ont fourni, du moins jusqu'à présent, que des résultats négatifs.

la région sous-maxillaire, dont le liquide de ponction a fourni une culture impure, mais riche en *Streptobacilles*. L'aspect de cet abcès, son siège, sa flore microbienne permettaient de le rapporter à une morsure. Rappelons qu'il est fréquent de constater, chez les souris de passages, des abcès à *Streptobacilles* au point d'inoculation.

Conclusions. — L'ensemble de nos constatations nous permet de formuler les conclusions suivantes : 1° le *rhumatisme poly-articulaire infectieux de la souris, provoqué par le Streptobacillus moniliformis, peut se transmettre spontanément d'animaux malades à sujets sains, par simple cohabitation dans le même bocal maintenu à l'obscurité* ; 2° la période d'incubation de la maladie transmise a été de neuf à vingt-six jours pour la forme septicémique, et de vingt-trois jours pour la forme poly-articulaire ; 3° la transmission semble s'effectuer soit par morsure, soit par souillure avec l'urine de souris malades, laquelle peut contenir le *Streptobacillus moniliformis*.

VII. — Variations saisonnières de la virulence du *Streptobacillus moniliformis* (1).

Les observations concernant les variations saisonnières de la virulence des microbes pathogènes sont accueillies avec un intérêt croissant, depuis que l'on essaie de préciser les raisons de la périodicité, également saisonnière, de certaines maladies épidémiques, telle la poliomyélite. Aycock (2) et ses collaborateurs ont remarqué que la courbe saisonnière de la paralysie infantile se superpose à d'autres courbes établies d'après les changements saisonniers du poids de certains organes (3), de la teneur en iode de la glande thyroïde (4), de la richesse du sang en phosphates chez les enfants (5), voire même de la sensibilité du cobaye à la toxine diphtérique (6) et celle de la

(1) LEVADITI et SELBIE. *C. R. Soc. Biol.*, **406**, 1931, p. 25.

(2) AYCOCK. *Journ. of prevent. Med.*, **3**, 1929, p. 245.

(3) BROWN, PEARCE et VAN ALLEN. *Journ. of exper. Med.*, **44**, 1926, p. 653.

(4) SEIDELL et FINGER. *Journ. of biol. Chem.*, **13**, 1913, p. 517.

(5) HESS et LUNDANGEN. *Proc. Soc. exper. Biol. and Med.*, **19**, 1921-1922, p. 380.

(6) SINDMERSSEN et GLENNY. *Journ. of Hyg.*, **9**, 1909, p. 399.

souris aux acétonitriles (1). L'organisme animal paraît en fonction du milieu où il vit; or, comme ce milieu varie suivant les saisons, il s'ensuit logiquement que le même organisme doit subir des changements se traduisant, entre autres, par des variations périodiques de sa réceptivité aux virus (2). Tout récemment encore, l'un de nous, en collaboration avec Schmutz et Willemin (3), a insisté sur les relations entre les variations de la température ambiante, de l'humidité relative de l'air et du niveau de la nappe d'eau souterraine d'une part, la morbidité absolue de la maladie de Heine-Medin d'autre part. Ces phénomènes météorologiques favorisent la propagation du germe poliomyélitique, en modifiant la réceptivité de l'organisme humain par un mécanisme que nous ignorons encore, mais que l'on pourrait certainement préciser, si l'on étudiait méthodiquement l'influence de la lumière, des rayons ultraviolets, de l'humidité, de la carence ou de l'hypervitaminose sur les organismes réceptifs. D'ailleurs, des cliniciens avertis ont déjà insisté sur le rôle joué par la carence solaire dans la périodicité saisonnière de certaines maladies contagieuses. Ainsi, Woringer (4) divise les infections épidémiques en deux groupes : les *héliophiles* (type poliomyélite) et les *héliophobes* (type grippe).

Nous avons enregistré, au cours de l'année 1930, des faits démontrant les variations saisonnières de la virulence du *Streptobacillus moniliformis*. Les voici :

Depuis son isolement (9 décembre 1929) jusqu'à présent, (janvier 1931), le *Streptobacillus moniliformis* a été entretenu en culture sur bouillon-sérum de cheval et inoculé, aussi régulièrement que possible, à des souris, de manière à conserver intacte sa virulence. Or, vers la mi-janvier 1930, cette virulence a subi des modifications qui se sont déclarées sans que nous ayons modifié d'une manière appréciable notre technique. Alors qu'en décembre les cultures inoculées à des souris, de la même provenance, provoquaient fréquemment des arthrites généralisées, les mêmes cultures, inoculées à partir

(1) HUNT. *Hyg. Lab. Bull.*, 37, 1907.

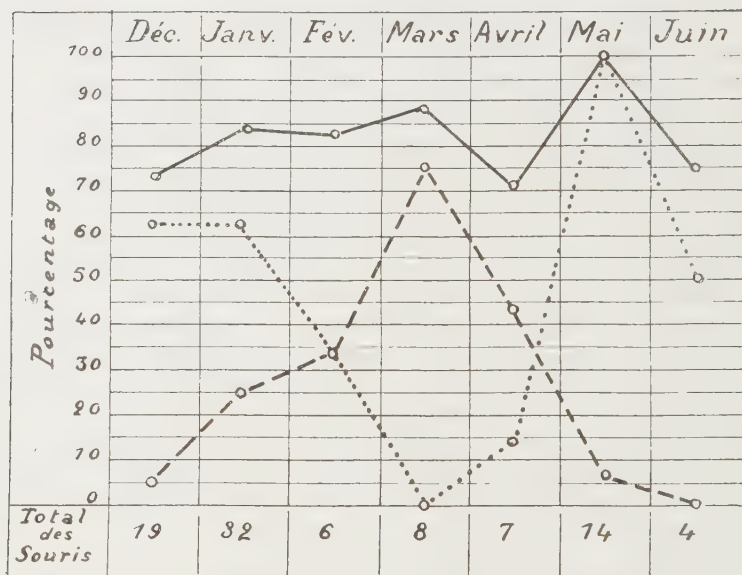
(2) LEVADITI et LÉPINE. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 104, 1930, p. 173.

(3) LEVADITI, SCHMUTZ et WILLEMIN. *Bull. de l'Acad. de Méd.*, 104, 1930, p. 505.

(4) WORINGER. *Rev. franç. de Pédiatrie*, 2, 1926, p. 161.

de janvier, ont déterminé la mort des animaux par septicémie et n'occasionnaient que rarement des lésions articulaires. Ainsi, en mars, 75 p. 100 des souris inoculées succombaient avant le sixième jour, sans présenter d'arthrites, alors qu'en décembre 60 p. 100 des animaux survivaient plus longtemps et présentaient des accidents rhumatismaux associés à la myocardite aiguë ou chronique.

Nous avons pensé, au premier abord, qu'il s'agissait là d'une



COURBE 1.

— Pourcentage des inoculations positives.
 Pourcentage des cas d'arthrite.
 ----- Pourcentage des souris mortes de septicémie avant le sixième jour.

exagération de la virulence de *Streptobacillus moniliformis*, due aux passages répétés sur l'organisme de la souris. Ce qui s'est passé par la suite n'a pas confirmé cette hypothèse. En effet, une véritable « inversion » du phénomène s'est produite à partir de la mi-avril, inversion qui a persisté pendant quelques mois. Elle a consisté en ce fait qu'à partir de cette date la fréquence des arthrites a augmenté au fur et à mesure que le nombre des cas de mort précoce par septicémie est revenu à ce qu'il

était en décembre 1930. Les courbes ci-contre rendent compte de cette variation de la virulence du *Streptobacillus moniliformis* (courbe 1).

Nous avons recherché quelles pouvaient être les raisons de ce changement de la réceptivité d'animaux vivant dans des conditions apparemment identiques. Nos recherches ont abouti à cette conclusion que seule une variation saisonnière de la sensibilité de l'organisme de la souris fournit une explication plausible du phénomène décrit ci-dessus. Nous continuons nos observations, afin de voir si, au printemps prochain, ce phénomène se reproduira. Quoi qu'il en soit, on ne peut s'empêcher, devant de telles constatations, de faire le rapprochement entre la périodicité saisonnière des arthrites et des myocardites provoquées par le *Streptobacillus moniliformis* chez la souris, et le caractère, également périodique, du rhumatisme articulaire aigu de l'homme (maximum en mars-avril-mai; renseignement fourni par M. Grenet).

Conclusions. — Il a été constaté une variation de la virulence du *Streptobacillus moniliformis* (agent pathogène de l'arthrite infectieuse de la souris), variation offrant un caractère nettement saisonnier et se traduisant : 1° par une fréquence maxima des arthrites en mai, et 2° par une fréquence maxima des formes septicémiques exemptes de localisation articulaire en mars (1).

VIII. — Immunité. Vaccination.

a) IMMUNITÉ NATURELLE. — Certaines souris paraissent bénéficier d'un état réfractaire naturel, bien qu'elles proviennent des mêmes élevages que les animaux réceptifs de la même espèce. Voici de quelle manière se traduit cette immunité spontanée : une souris est inoculée par voie sous-cutanée ou intraveineuse, en même temps que plusieurs de ses congénères, mais alors que celles-ci réagissent par la forme septicémique ou polyarthritique de la maladie la souris réfractaire conserve l'apparence

(1) Il est intéressant de remarquer que le sujet atteint d'érythème polymorphe, chez lequel nous avons isolé, pour la première fois, le *Streptobacillus moniliformis* et qui était atteint de septicémie, est tombé malade au mois de mars également.

d'un animal bien portant. Réinoculée à plusieurs reprises avec des cultures reconnues virulentes, elle résiste parfaitement. En voici deux exemples :

Souris 37, inoculée le 27 décembre 1929 par voie sous-cutanée. Aucune réaction. Deux autres inoculations, effectuées par la même voie, le 19 janvier 1930 et 26 mai de la même année, restent sans effet. L'animal est mort dix jours après la dernière injection. *Cultures négatives.* *Souris 91*, inoculée par voie sous-cutanée, à trois reprises (le 28 janvier 1930, le 15 mai et le 26 juin). Aucune réaction. Morte après cent soixante-cinq jours. *Cultures négatives.* *Examen histologique* : absence de lésions d'arthrite ou de myocardite.

b) IMMUNITÉ ACQUISE. — Il nous a été possible de vacciner des souris réceptives par des injections répétées de cultures streptobacillaires préalablement chauffées à 60°. Ces injections ont été pratiquées par voie sous-cutanée. Les résultats de ces essais sont consignés dans le tableau suivant :

TABLEAU II.

SOURIS	NOMBRE d'injections sous-cutanées	ÉPREUVE voie	DATE de l'épreuve (en jours)	RÉACTION	RÉSULTAT de la vaccination
68	2	Intraveineuse.	12	Négative.	Positif.
70	2	Sous-cutanée.	13	Polyarthrite.	Négatif.
72	3	Sous-cutanée.	47	Négative.	Positif.
170	3	Sous-cutanée.	49	Négative.	Positif.
171	3	Sous-cutanée.	49	Négative.	Positif.
71	2	Articulaire.	43	Arthrite.	Négatif.
169	3	Sous-cutanée et articulaire.	49	Négative, sauf ar- thrite au point d'inoculation.	Partiel.

Ce tableau montre que parmi les sept souris soumises à la vaccination par des injections sous-cutanées de cultures tuées par le chauffage à 60°, cinq ont acquis un état réfractaire absolu ou partiel. L'immunité incomplète s'est manifestée, chez certains autres animaux, par une réceptivité exclusive de l'articulation (siège de l'inoculation d'épreuve), non suivie de généralisation.

Cet état réfractaire acquis se révèle également lorsque l'injection du *Streptobacillus moniliformis* a été pratiquée par voie intrapéritonéale. On peut constater, en effet, tous les signes d'une bactériolyse locale, rappelant le phénomène de

Pfeiffer. Ajoutons que chez les lapins qui survivent à la contamination par des inoculations diverses le sérum peut acquérir des propriétés agglutinantes d'un taux assez élevé.

Conclusions générales.

L'ensemble de nos recherches concernant le Streptobacillus moniliformis, microorganisme isolé chez des souris atteintes de rhumatisme polyarticulaire infectieux, montre que l'étude de la maladie expérimentale élucide jusqu'à un certain point l'étiologie et la pathogénie de certains processus similaires de l'homme. En effet, il nous a été possible de reproduire, chez l'animal, la plupart des symptômes et des lésions qui caractérisent les rhumatismes aigus ou chroniques humains, ainsi que leurs complications. La triade : polyarthrite, endocardite, myocardite, à laquelle s'associe un état septicémique, apparaît, au même titre, chez la souris et chez l'homme, quelle que soit la voie de pénétration du microbe dans l'organisme. Des variations saisonnières de l'aspect clinique de la maladie expérimentale sont à rapprocher de la périodicité, également saisonnière, du rhumatisme articulaire aigu, type Bouillaud. D'où la nécessité de poursuivre des recherches étiologiques analogues dans le domaine, si intéressant et si peu exploré, du rhumatisme articulaire humain.

(Institut Pasteur et Bourse Henri de Rothschild.)

DE L'ANTIVIRUS PNEUMOCOCCIQUE ET DE SON ACTION SUR LA VIRULENCE DU PNEUMOCOQUE

par M. OKISCHIO, directeur de l'Hôpital Okischio, à Kobé.

Un des caractères importants des antivirus, signalé dès ses premières recherches par Besredka, est leur pouvoir d'empêcher les germes correspondants de se développer, sans pour cela exercer la moindre action bactéricide. En poursuivant des expériences dans le même ordre d'idées, plusieurs auteurs ont décrit des modifications morphologiques que font subir aux microbes les antivirus correspondants; ainsi, il a été observé que les colibacilles acquièrent une tendance à se réunir en amas; les bacilles typhiques, au contraire, deviennent, sous l'influence des antivirus spécifiques, moins agglutinables.

Il était surtout intéressant de connaître comment se comporte la virulence des microbes mise en présence de leur antivirus. Il existe déjà à cet égard des recherches faites par les professeurs Ohba et Takekawa; ces auteurs ont montré que les staphylocoques pathogènes, laissés pendant quelque temps en contact avec l'antivirus spécifique, se transforment en saprophytes. Nous nous sommes proposé de voir, à notre tour, si une perte de pouvoir pathogène analogue s'observe également pour d'autres microbes. Nos recherches ont porté sur le pneumocoque du type I et l'antivirus correspondant, préparé d'après le procédé de Besredka : la culture en bouillon glucosé fut laissée pendant deux semaines à l'étuve, puis filtrée; le filtrat fut réensemencé, laissé pendant une semaine à l'étuve, puis à nouveau filtré; dans ce second filtrat, le pneumocoque ne poussait plus. Avec cet antivirus et le pneumocoque correspondant, il a été fait quatre sortes d'expériences.

EXPÉRIENCE I. — Quatre cultures de vingt-quatre heures sur gélose additionnée de 10 p. 100 de sang de chèvre ont été traitées de la façon suivante : dans une des cultures devant servir de contrôle, on ajouta 10 c. c. de bouillon glucosé et on la laissa à l'étuve pendant six heures; les trois autres cultures furent mises en contact avec 10 c. c. d'antivirus pneumococcique pendant six heures, trois heures et une heure; après quoi, les quatre cultures furent diluées dans de l'eau physiologique et injectées à des souris aux doses de 1/50.000 et de 1/100.000 de c. c.

TABLEAU I.

Dilutions	DURÉE DE CONTACT AVEC L'ANTIVIRUS						TÉMOIN	
	Six heures		Trois heures		Une heure		Six heures	
	1/100.000	1/50.000	1/100.000	1/50.000	1/100.000	1/50.000	1/100.000	1/50.000
Survie en heures :								
24							+	+
36								
48					+	+		
60			+	+				
72		+						
84	+							

Dose minima mortelle : 1/100.000 de culture.

Il résulte du tableau I que les deux souris ayant reçu le virus pneumococcique provenant de la culture de contrôle sont mortes dans les vingt-quatre heures; toutes les autres souris, inoculées avec du virus ayant été en contact avec de l'antivirus, ont eu des survies d'autant plus considérables que ce contact avait été plus long.

EXPÉRIENCE II. — Trois cultures de pneumocoque de vingt-quatre heures sur gélose inclinée sont additionnées de 10 c. c. de bouillon glucosé et laissées à l'étuve pendant six heures, trois heures et une heure; trois autres cultures semblables sont additionnées de 10 c. c. d'antivirus et laissées également à l'étuve pendant six heures, trois heures et une heure. Les microbes sont ensuite émulsionnés et dilués, après une forte centrifugation, dans de l'eau physiologique; on en injecte à des souris 1/100.000 et 1/10.000 de c. c.

Il résulte du tableau II que la virulence du pneumocoque additionné de bouillon glucosé augmente en raison directe de la durée du contact avec ce dernier: c'est l'inverse qui se produit pour le pneumocoque ayant été en contact avec l'antivirus: sa virulence devient d'autant plus faible que ce contact a été plus long.

Il résulte du tableau III que le contact avec le filtrat de vingt-quatre heures n'a aucune action sur la virulence : le pneumocoque demeure aussi virulent que celui de la culture témoin. Pour ce qui est des pneumocoques ayant été en contact avec des filtrats de trois jours, de cinq jours et de sept jours, leur virulence est d'autant plus atténuée que les cultures filtrées avec lesquelles on les a mis en contact étaient plus âgées; ainsi, le contact, pendant trois heures, avec la culture filtrée de sept jours a suffi pour rendre inoffensive la dose minima mortelle. Notons que le contact pendant le même temps avec l'antivirus a atténué la virulence du pneumocoque au point de permettre à la souris de survivre à 5 doses mortelles.

EXPÉRIENCE IV. — Quatre cultures de pneumocoques âgées de vingt quatre heures sur gélose sont additionnées d'antivirus pneumococciques (10 c. c.), d'antivirus staphylococcique (10 c. c.), d'antivirus streptococcique (10 c. c.) et de bouillon ordinaire (10 c. c.). Ces mélanges sont laissés à l'étuve à 37° pendant six heures, après quoi les microbes sont émulsionnés, centrifugés et dilués dans de l'eau physiologique; 1/5.000 de cette dilution représente une dose mortelle pour la souris.

TABLEAU IV.

		EFFET DU CONTACT DES PNEUMOCOQUES AVEC							
		antivirus staphylococ- ciques		antivirus streptococ- ciques		antivirus pneumococ- ciques		TÉMOIN	
Dilutions		1/1.000	1/5.000	1/1.000	1/5.000	1/1.000	1/5.000	1/1.000	1/5.000
Survie en heures :									
12									
24			+						
36		+		+		Survie définitive.	Survie définitive.	+	+
48					+				
60									
72									
84									

Dose minima mortelle : 1/5.000 de culture.

Il résulte du tableau IV que les souris qui ont reçu des pneumocoques ayant été en contact avec des antivirus hétérogènes, staphylococcique et streptococcique, ont eu sur les témoins une très légère survie; seules, ont survécu d'une façon définitive les souris ayant reçu des pneumocoques ayant été en contact avec l'antivirus correspondant.

CONCLUSIONS.

Les cultures filtrées de pneumocoques, mises en contact avec ce même germe, exercent sur ce dernier une action atténuante ;

cette action est d'autant plus manifeste que les cultures sont plus âgées.

Le maximum du pouvoir atténuant appartient à l'antivirus pneumococcique; ce pouvoir est manifeste après trois heures et, mieux encore, après six heures de contact à 37°.

Le pouvoir atténuant de l'antivirus pneumococcique est spécifique.

ESSAI DE CLASSIFICATION, SELON LEUR ACTION SUR LES TYPES S ET R, DES BACTÉRIOPHAGES ACTIFS POUR LE BACILLE DE HISS

par P. DENYS.

(Travail du laboratoire du professeur A. Lemaire.
Université de Louvain.)

Le présent travail a pour objet l'étude des relations existant entre les mutations bactériennes (S et R) et la susceptibilité du bacille de Hiss à la lyse transmissible.

D'Hérelle dans sa monographie et ses diverses publications a affirmé l'« unicité » du bactériophage, lequel par adaptation peut acquérir des virulences variables d'une souche à l'autre : tandis que Gratia observe que les bactériophages du staphylocoque et du *B. coli* doivent être considérés comme des entités distinctes, étant donné qu'il est impossible d'adapter le bactériophage du staphylocoque au *B. coli* et *vice versa*.

D'autre part, Bruynoghe [1] et ses élèves ont démontré par une série de recherches que des bactériophages actifs pour un microbe donné pouvaient être distincts au point qu'on devait admettre la pluralité des principes. Cette notion fut dans la suite confirmée par la plupart des auteurs, particulièrement par Gratia [2] pour les staphylocoques.

Bail [3] en 1922 note l'existence de bactériophages à grandes, moyennes et petites plages ; à ces variations dans les grandeurs des plages correspondent des différences dans l'action de ces principes sur les microbes sensibles. Le bactériophage à petites plages est stable. Au contraire, celui à grandes plages en régénère de grandes et de petites, malgré de nombreux essais de purification.

Watanabé [4] a montré que ces principes à plages de grandeur différente se distinguent au point de vue de leurs pro-

priétés antigènes. Ashehow [5], pour le bacille de Flexner, a confirmé l'existence de principes à grandes et à petites plages.

En 1923, dans un important mémoire, Bail [6] insistait déjà sur la pluralité des bactériophages et montrait que des bactériophages anti-Shiga peuvent se distinguer entre eux par leur mode d'action sur gélose et en bouillon, par leur rapidité de régénération, leur pouvoir d'attaquer d'autres microbes et par la nature des cultures secondaires engendrées sous leur influence. La résistance de celle-ci étant hautement spécifique, elle permettrait d'établir une classification des bactériophages. Mais ce mode de classification est d'une technique assez complexe et amènerait sans aucun doute la création d'un nombre illimité de types.

Bordet et Ciuca [7], étudiant les conditions de régénération du principe actif pour le *B. coli*, sont amenés à distinguer un principe « fort » et un principe « faible ». Ce dernier s'obtient en ajoutant à une suspension donnée de *B. coli* la plus petite quantité de principe fort qui se montre active. Le principe régénéré dans ces conditions, quoique pouvant être tout aussi concentré que le principe original, ne produit plus qu'une lyse partielle suivie rapidement d'un développement abondant de culture secondaire. Le principe fort agit aussi bien sur la forme *S* que sur la forme *R* du *B. coli* (ou, pour employer la terminologie de Bordet, sur le type bombé et sur le type plat). Le principe faible agit très énergiquement sur le type *R*, beaucoup plus faiblement sur le type *S* et seulement à concentration élevée. Entretenu aux dépens du type *S*, il se montre stable. Il reste « faible » malgré des passages répétés. On peut toutefois le transformer en principe fort en le faisant agir en concentration élevée sur le *B. coli S* et en transférant massivement le mélange dans un nouveau tube alors que la lyse est en cours [18].

Brutsaert [8] parvient également à transformer des principes faibles (obtenus soit selon la technique de Bordet, soit en traitant le principe original par le monochlorhydrate de quinine en principes forts. D'autre part, la distinction en principes forts et faibles n'est pas nette, car entre les deux extrêmes existent tous les intermédiaires possibles (Bordet).

Gratia et De Kruif [9] ont confirmé la découverte de Bordet.

Ils montrent en outre que la dissociation du principe original en fort et faible n'est pas due au fait que celui-ci contient un mélange de divers bactériophages. Il s'agit bien d'une transformation et non d'une sélection de bactériophages différents déjà présents comme tels avant la dissociation. Selon ces auteurs, les principes faibles sont stables; ils ne régénèrent jamais de principe fort.

Dans une étude ultérieure, Gratia [10] montre qu'à la différence d'énergie des principes correspondent des différences dans les grandeurs des plages, telles que les avaient décrites Bail et Ashehow : les principes faibles donnent de grandes plages, les principes forts en donnent de grandes et de petites, ces dernières pouvant par sélection être obtenues et régénérées à l'état pur. Ainsi donc la classification de Bail et Ashehow, basée sur la grandeur des plages, se superpose à celle de Bordet établie sur la différence d'énergie des principes. Gratia isole en outre un *B. coli* *S* et un *B. coli* *R* et montre que le type *S* est sensible au principe à grandes plages, résistant à l'autre. L'inverse se vérifie pour le principe à petites plages. Mais à côté de ces individus résistants, soit à l'un, soit à l'autre de ces principes, il y en a d'autres qui sont également sensibles aux deux. D'autres caractères distinguent encore le principe à grandes plages de celui à petites plages : le premier est détruit à 60-62°, le second seulement à 70°. La culture secondaire résistante au premier est du type *R* et est sensible au principe à petite plage qui lui donne une culture secondaire formée de petites colonies convexes, bombées, luisantes, donnant un trouble uniforme en bouillon et sensibles au principe à grande plage. Celui-ci, contrairement au principe à petites plages, se montre instable au cours de passages ultérieurs : il reproduit un mélange de grandes et de petites plages. Ils sont différents sérologiquement, quoiqu'il existe entre eux une certaine parenté antigénique : le sérum anti-grandes plages neutralise toutes celles-ci et une partie des petites plages et *vice versa* pour le sérum anti-petites plages. En 1925, Mc Kinley [11], montra également que les principes forts et faibles sont différents antigéniquement.

En 1924, Hadley [12], pour le bacille de Shiga, confirma l'existence de principes à grandes et à petites plages : ce dernier

est stable, l'autre régénère un mélange des deux types. Il n'a pas rencontré de plages de grandeur intermédiaire.

En 1928 [13], le même auteur, en collaboration avec Dabney, établit les mêmes faits pour un bactériophage actif pour le bacille paratyphique B. Il appelle le bactériophage à grandes plages « principe *a* »; celui à petites plages « principe *b* ». Chacun d'eux lyse réciproquement les cultures secondaires résistantes à l'autre. Le principe *a* est détruit par un chauffage de *trente minutes* à 63°, le principe *b* par un chauffage de *trente minutes* à 75°. Le principe *a* s'est montré stable lors des premiers passages, mais ultérieurement il régénère *b* aussi bien que *a*, alors que le principe *b* ne régénère que de petites plages. Ils lysent tous deux aussi bien le type *S* que le type *R*, mais la zone périphérique des plages données par le principe *a* est différente, selon que ce principe agit sur l'un et l'autre de ces types.

Hadley [14], dans un chapitre de sa très intéressante étude d'ensemble sur la bactériophagie, analyse les travaux ayant trait aux principes forts et faibles, aux principes à grandes et à petites plages, et fait ressortir les rapports très nets existant entre ces caractères et le rayon d'action de ces bactériophages sur les types *S* et *R*. Cette monographie, entre autres mérites, a celui de bien montrer la nécessité de poursuivre les études de la bactériophagie en tenant compte des mutations bactériennes telles qu'Arkwright le premier les a décrites.

Burnet [15] a étudié l'influence des mutations bactériennes (*S* et *R*) sur la sensibilité du bacille *enteritidis* et du bacille *sanguinarium* à une série de bactériophages. Il constate que certains principes ne lysent que la forme *S*, d'autres la forme *R*, d'autres aussi bien les formes *S* que *R*; d'autres enfin lysent fortement le type *R* et faiblement le type *S*. Il s'attache surtout à préciser les caractères des cultures résistantes nées sous l'influence de ces différents principes et les relations existant entre les modifications sériques et l'acquisition de la résistance. En collaboration avec Mc Kie [16] il étend ses recherches aux bacilles de Flexner, pour lesquels il trouve 18 principes lysant la forme *S* et la forme *R* et 9 ne lysant que l'un ou l'autre type. Nous ne nous étendrons pas davantage sur ces intéressantes recherches : elles ont surtout trait à la nature de la résistance, question que nous ne traiterons pas dans ce tra-

vail, et n'insisteront pas sur la stabilité et les caractères des principes actifs pour *S*, pour *R* ou pour *S* et *R*.

Gratia [17] a isolé 17 bactériophages antistaphylococciques, 5 sont polyvalents; ils lysent les staphylocoques dorés, blancs, citrins et saprophytes, 12 sont monovalents; ils ne lysent que les staphylocoques blancs. Les principes polyvalents sont lents à se régénérer, ne donnent guère lieu à la transformation vitreuse de Twort et ne reproduisent que de petites plages. Les principes monovalents donnent de grandes plages entourées de larges halos et reproduisent intensément le phénomène de Twort. En plus, ces deux groupes se distinguent sérologiquement: un sérum préparé avec l'un des bactériophages du premier groupe neutralise complètement tous les bactériophages de ce groupe; il n'exerce qu'une action passagère et variable sur ceux du deuxième groupe, et réciproquement. Gratia conclut que sans doute ces faits sont à rattacher au phénomène de mutations bactériennes et se propose de poursuivre ses études dans ce sens.

Dans ce travail nous avons voulu rechercher jusqu'à quel point il y a lieu d'établir une distinction nette entre les bactériophages agissant sur la forme *S* ou sur la forme *R* ou simultanément sur les formes *S* et *R* d'un microbe donné; si, éventuellement, ces différentes catégories de bactériophage pouvaient être transformées l'une dans l'autre, et si, outre leur rayon d'action, d'autres particularités permettaient de les caractériser et d'en faire des groupes bien distincts.

MICROBE EMPLOYÉ. — Nous nous sommes servi d'un bacille dysentérique de Hiss provenant d'une collection de laboratoire et présentant tous les caractères du type *S*. La forme *R* fut obtenue par passages quotidiens dans du bouillon de pH 7,8 contenant 5 p. 100 de sérum anti-Hiss actif à 1 5.000. Lors des premiers passages, la culture poussait sous forme de volumineux amas compacts, difficiles à dissocier, le liquide restant clair. Dès le quatrième passage, les agglomérats étaient moins compacts et plus faciles à désagréger. La culture du sixième passage présentait un développement en fins grumeaux qui se déposaient rapidement et qui, par agitation, donnaient un

trouble homogène. Cet aspect devait persister dans les passages suivants. La culture du neuvième passage fut repiquée sur gélose de façon à donner des colonies isolées. Celles-ci, à vrai dire, ne présentaient pas l'aspect « rough » classique, tel que l'a décrit Arkwright [19], mais, vues par transparence, elles paraissaient jaunâtres, alors que les colonies *S* sont bloutées. Burnet [15], dernièrement, a fait la même constatation pour les colonies *R* des bacilles du groupe *enteritidis*. Repiquées en bouillon, ces colonies donnent un développement en grumeaux, se sédimentant rapidement, de telle sorte que dès la douzième heure le liquide est parfaitement clair, alors que la forme *S* donne un trouble homogène, diffus, sans dépôt. Après trois sélections successives de colonies isolées les cultures *S* et *R* ainsi purifiées furent repiquées sur gélose neutre et conservées à la température du laboratoire.

Dans la suite, la culture de stock *S* fut repiquée hebdomadairement; la culture *R* seulement tous les mois.

Pour toutes nos expériences, nous nous sommes servi de cultures jeunes (quinze heures) en bouillon légèrement acide, ensemencées aux dépens des cultures de stock.

(Comme Koser et Styron [20] l'ont encore constaté dernièrement pour le bacille dysentérique de Sonne, un milieu légèrement acide est moins favorable aux mutations spontanées qu'un milieu alcalin.)

TECHNIQUE EMPLOYÉE

DANS LES EXPÉRIENCES DE BACTÉRIOPHAGIE.

Pour toutes nos expériences de bactériophagie, nous nous sommes servi de bouillon de pH 7,8 alcalinisé au moyen d'un mélange de phosphates neutres et acides, tel que le recommande d'Hérelle. Tous les essais sur milieux solides furent faits dans des boîtes de Pétri sur gélose à 48 p. 1.000 coulé en couche épaisse (8 à 10 millimètres).

Les cultures furent toujours faites à 30°. Sauf mention contraire, dans toutes les expériences dans lesquelles il s'agissait de s'assurer de la présence d'un bactériophage actif soit pour *S*, soit pour *R*, nous nous sommes servi de la méthode suivante :

une anse de filtrat à éprouver est déposée à la surface de la gélose; après évaporation du liquide, la gélose est ensemencée d'une anse de culture jeune de Hiss *S* ou de Hiss *R* diluée au 1/10. Nous avons, en effet, constaté maintes fois qu'un principe très peu actif était facile à mettre en évidence sur milieu solide, alors qu'en bouillon il pouvait passer inaperçu, à moins d'entreprendre une série de passages.

Disons dès maintenant que nous appellerons filtrats *S* et filtrats *R* les filtrats provenant respectivement d'une culture ensemencée au moyen de *S* ou de *R* et que par principe *S* ou principe *R* nous désignons des principes entretenus soit aux dépens du type *S*, soit aux dépens du type *R*.

CHAPITRE PREMIER

ISOLEMENT DES BACTÉRIOPHAGES. — Neuf échantillons de fumier, numérotés de VII à XV, furent répartis séparément en deux séries de tubes contenant chacun 30 cent. cubes de bouillon.

Une série fut ensemencée de quelques gouttes de Hiss *S*, l'autre de quelques gouttes de Hiss *R*. Après incubation de vingt-quatre heures, les contenus des 18 tubes furent filtrés et les filtrats éprouvés au point de vue de leur pouvoir lytique vis-à-vis de *S* et de *R*.

Les filtrats *SVII*, *SVIII*, *SX*, *SXI*, *SXV* ainsi que les filtrats *RVII*, *RVIII*, *RX*, *RXI*, *RXIII* et *RXV* se montrèrent fortement actifs pour *S* et pour *R*. Les filtrats *SIX* et *SXIII* agissaient fortement sur *S* et faiblement sur *R*. Les filtrats *SXII*, *SXIV*, *RXII* et *RXIV* se montrèrent complètement inactifs, le filtrat *RIX* presque inactif; ils furent rejetés. Les 13 filtrats restants furent dilués et étalés sur gélose de façon à donner des plages isolées, les filtrats *S* étant éprouvés vis-à-vis de *S*, les filtrats *R* vis-à-vis de *R*.

Une ou, au maximum, trois plages pour chaque filtrat furent sélectionnées et portées dans un tube contenant 5 cent. cubes d'eau physiologique. Chacun des tubes fut filtré immédiatement et le filtrat éprouvé vis-à-vis de *S* et de *R*. Nous en donnons le résultat dans le tableau I.

TABEAU I. — Susceptibilité des types *S* et *R* aux principes isolés.

PRINCIPES	± <i>S</i>	± <i>R</i>
<i>S</i> VII <i>a</i>	++	++
<i>S</i> VII <i>b</i>	++	++
<i>S</i> VIII <i>a</i>	++	—
<i>S</i> VIII <i>b</i>	++	—
<i>S</i> IX <i>a</i>	++	—
<i>S</i> X <i>a</i>	++	—
<i>S</i> X <i>b</i>	++	—
<i>S</i> XI <i>a</i>	++	—
<i>S</i> XI <i>b</i>	++	++
<i>S</i> XI <i>c</i>	++	++
<i>S</i> XIII <i>a</i>	++	—
<i>S</i> XIII <i>b</i>	++	—
<i>S</i> XV <i>a</i>	++	+
<i>R</i> VII <i>a</i>	++	++
<i>R</i> VIII <i>a</i>	++	++
<i>R</i> X <i>a</i>	++	++
<i>R</i> XI <i>a</i>	++	++
<i>R</i> XII <i>a</i>	++	++
<i>R</i> XV <i>a</i>	++	—
<i>R</i> XV <i>b</i>	—	++

++ , pas de culture gélose stérile; ±, culture « grise » avec ébauche de plages plus ou moins confluentes; —, culture normale.

Nous avons donc 7 principes n'agissant que sur *S* (= principes *anti-S*); 12 principes agissant sur *S* et sur *R* (= principes *anti-SR* ou *anti-RS* selon qu'ils sont entretenus aux dépens de *S* ou de *R*); un seul principe n'agissant que sur *R* (= principe *anti-R*).

ESSAI D'ADAPTATION DES PRINCIPES *anti-S* AU TYPE *R*. — Les principes *anti-S* se montrent tous stables, c'est-à-dire que, même après de nombreuses générations aux dépens du type *S*, ils n'acquièrent jamais le pouvoir d'attaquer le type *R*; un principe *anti-S*, actif à $1-10$ pour le type *S*, n'aura pas la moindre action sur le type *R*, dût-il être éprouvé vis-à-vis de celui-ci à l'état pur.

Afin de nous assurer que chacun de nos vingt bactériophages provenait d'une même plage et n'était pas constitué d'un mélange de principes différents, nous avons entrepris encore pour chacun d'eux trois purifications successives par sélection de plages isolées. Les principes ainsi purifiés furent régénérés par un passage aux dépens de Hiss *S* ou de Hiss *R* selon qu'il

s'agissait d'un principe *S* ou *R* et éprouvés à nouveau vis-à-vis de *S* et *R*. Les résultats furent identiques à ceux du tableau I.

Nous avons essayé d'adapter nos principes *anti-S* au type *R* de la façon suivante : pour chaque principe nous entreprenons deux séries de passages. Dans la première série, chaque tube, à chaque passage, est additionné d'une goutte du filtrat précédent et d'une goutte d'une jeune culture *R*. Dans la seconde série nous ajoutons, en outre, à chaque tube, quelques gouttes d'une jeune culture *S*. Nous faisons deux passages en vingt-quatre heures et chaque filtrat non dilué est éprouvé sur gélose vis-à-vis de *S* et de *R*.

Dans le tableau II nous donnons le résultat d'une de ces expériences pour le bactériophage *SXa*. Tous les autres principes *anti-S*, soumis à la même épreuve, ont fourni des résultats identiques.

TABLEAU II. — Essai d'adaptation du principe *SXa* au type *R*.

Eprouvés vis-à-vis de	FILTRATS DE			
	<i>SXa + R</i>		<i>SXa + R + S</i>	
	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>
1 ^o passage	++	—	++++	—
2 ^o	+	—	++++	—
3 ^o	±	—	++++	—
4 ^o	—	—	++++	—
5 ^o	—	—	++++	—
6 ^o	—	—	++++	—
7 ^o			++++	—
8 ^o			++++	—
9 ^o			++++	—
10 ^o			++++	—

++++, pas de culture; ++, traces de culture; +, plages confluentes; ±, plages isolées; —, culture normale.

Nous constatons donc que le bactériophage *SXa* :

1^o Ne se régénère pas aux dépens du type *R*. Comme le tableau l'indique, à partir du quatrième passage, le filtrat, par suite des dilutions successives, était sans action sur la souche *S*.

2° Que, même régénéré aux dépens de *S* en présence d'individus du type *R*, il ne s'adapte pas à celui-ci malgré dix passages consécutifs.

Nous avons répété ces expériences en les modifiant de diverses façons :

1° En prolongeant jusqu'à deux à trois jours la durée de chaque passage.

2° En variant les doses de filtrat et de bacilles *S* et *R* ajoutés à chaque passage.

Nous n'avons jamais pu réaliser une adaptation des principes *anti-S* au type *R*. Dans certaines expériences, la présence éventuelle de principe actif pour *R* fut recherchée par la méthode d'inhibition en milieu liquide; les résultats furent toujours négatifs.

PRINCIPES ACTIFS VIS-A-VIS DE *S* ET DE *R*. — Comme nous l'avons vu plus haut, de nos 20 principes isolés, 12 sont actifs sur *S* et sur *R*. 6 de ces principes furent toujours entretenus aux dépens de *S*, les 6 autres aux dépens de *R*. Chacun de ces derniers, même après de nombreux passages (jusqu'à dix-huit), s'est toujours montré actif pour *R* et pour *S* jusqu'à la même dilution limite $1-8$ à $1-11$. Il en est de même pour les principes *SVIIa*, *SVIIb*, *SXIb* et *SXIc*. Par contre, les principes *SIXa* et *SXVa*, dont une anse de la dilution $1-8$, étendue sur agarensemencé de *Hiss-S*, donne encore de nombreuses plages, n'agissent sur *R* qu'à condition de les éprouver à l'état concentré. Il est possible d'exalter la virulence pour *R* de ces deux principes en leur faisant subir quelques passages aux dépens de *R*, de préférence en présence du type *S*.

Bordet signale que les principes « forts » étudiés par lui peuvent être transformés en principe faible en ajoutant à une forte émulsion de microbes sensibles la plus petite dose du principe qui se montre active. Le bactériophage régénéré dans ces conditions se comporte comme un principe faible. Nous avons recherché si, en suivant la méthode de Bordet, il n'était pas possible de transformer un principe *anti-SR* en principe *anti-S*. Nos résultats furent toujours négatifs : le principe récupéré du dernier tube dans lequel s'était manifestée la lyse était actif pour *R* comme pour *S*.

PRINCIPE ACTIF VIS-A-VIS DE R SEUL. — Nous n'avons rencontré qu'un seul principe qui, actif vis-à-vis de *R*, n'impressionnait pas le type *S*. Nous en avons, sans succès, recherché d'autres dans de nouveaux filtrats de fumier. Les essais d'adaptation du principe *anti-R* au type *S*, faits suivant les mêmes méthodes que celles employées pour l'adaptation des principes *anti-S* au type *R*, furent toujours négatifs.

SENSIBILITÉ DU TYPE *O* AUX PRINCIPES *anti-S*, *anti-SR* ET *anti-R*. — Au cours de la transformation du bacille Hiss en Hiss *R* sous l'influence de passages dans le sérum *anti-Hiss S*, apparut le type intermédiaire appelé type *O*, qui, comme on le sait, est caractérisé par la grande irrégularité et la transparence de ses colonies sur gélose, l'extraordinaire polymorphisme des éléments bacillaires qui le constituent et sa grande instabilité. Au cours de repiquages successifs il a une tendance manifeste à se transformer en type *S* et surtout en type *R*.

Nous avons trouvé que tous les principes, *anti-SR* et *anti-R* lysaient le type *O* au même degré que le type *R*. Par contre, les principes *anti-S* se sont montrés complètement inactifs.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE PREMIER. — 20 principes furent isolés par le bacille de Hiss, 12 lysent le type *S* et le type *R* de ce bacille, 7 ne lysent que le type *S*, 1 seul ne lyse que le type *R*. Les essais d'adaptation des principes *anti-S* au type *R* et du principe *anti-R* au type *S* furent négatifs. Les principes *anti-SR* ne se sont jamais transformés en principes *anti-S* ou en principes *anti-R*. Nous pouvons donc classer en des groupes entièrement distincts les principes *anti-Hiss* selon qu'ils agissent sur *S*, sur *R* ou sur *S* et sur *R*.

CHAPITRE II

Les principes *anti-S*, *anti-SR*, *anti-R*, outre leur champ d'action, possèdent-ils d'autres caractéristiques propres à chaque groupe? C'est ce que nous avons recherché dans la seconde partie de ce travail. Dans ce but nous avons étudié l'aspect des plages sur gélose, la résistance à la température et le caractère antigénique des 20 principes.

1° ASPECT DES PLAGES SUR AGAR. — Disons d'abord que l'aspect des plages d'un bactériophage donné a toujours été le même, et cela, que l'on considère les plages reproduites par le principe lors de son premier isolement ou celles engendrées sous l'influence du même principe alors qu'il a déjà subi de nombreux passages (jusqu'à 20). Il s'agit donc d'un caractère stable.

Toutes ces expériences furent faites sur gélose à 18 p. 4.000 de $pH = 7,8$, coulé dans des boîtes de Petri en couche épaisse (8 millimètres). Nous avons employé deux techniques différentes : 1° après étalement d'un principe suffisamment dilué, la gélose estensemencée par étalement d'une anse pour 4 cent. carrés environ d'une jeune culture, soit du type *S*, soit du type *R* diluée au 1/10. 2° Un point de la surface de la géloseensemencée est touché avec un mince fil de platine trempé préalablement dans le filtrat pur à étudier. Par cette méthode on obtient une plage dont la grandeur correspond à celle des plus grandes plages obtenues après dilution et étalement du même principe. L'examen des plages est fait après dix-huit heures, quarante heures et parfois après trois jours d'étuve à 30°.

a) *Principes anti-S*. — Les principes *SXa*, *SXb*, *SXIa*, *SXIIIa* et *SXIIIb* sont essentiellement des principes à grandes plages à bords nets qu'aucun liséré spécial ne sépare de la culture normale environnante (V. fig. 4). Après dix-huit heures d'étuve leur diamètre est de 6 à 7 millimètres et il peut s'accroître légèrement encore dans la suite. Après trois jours d'étuve les plages des principes *SXI* peuvent atteindre 9 millimètres, mais dans ce cas la lyse n'est qu'incomplète à la périphérie qui se couvre en outre de minuscules colonies secondaires. Un léger halo large de 2 millimètres et difficilement perceptible n'a été constaté qu'autour des plages du principe *SXIII* et seulement quand celles-ci sont âgées de huit jours. Nous n'avons pas constaté l'existence de larges zones périphériques formées de culture modifiée telles que les a décrites Hadley pour son principe α . De petites plages peuvent apparaître parmi les grandes. Elles se distinguent toutefois du tout au tout des petites plages des principes *anti-SR* par le fait suivant : portées en eau salée, puis filtrées, diluées et étalées sur

gélose ensemencé d'*Hiss-S*, elles reproduisent toujours un mélange de grandes plages et de petites plages, qui, de nouveau, sont aptes à engendrer de grandes plages. Elles sont incapables de lyser le type *R*. Sans doute, il n'y a pas que l'individualité propre du principe dont dépend la grandeur des plages; elle peut être modifiée par des facteurs indépendants du principe lui-même, tels que : présence fortuite de quelques germes plus résistants, concentration trop élevée des microbes sensibles. L'apparition de ces petites plages peut encore s'expliquer par le fait que tous les corpuscules ne sont pas nécessairement doués de la même virulence.

Les principes *S VIII a* et *S VIII b* produisent des plages tout à fait spéciales que nous n'avons rencontrées avec aucun autre bactériophage. Allant du centre à la périphérie on rencontre (V. fig. 2) : 1° une petite plage de 1 à 1,5 millimètres de diamètre; 2° une zone de culture apparemment non modifiée, large de un bon millimètre et ayant tout l'aspect d'une culture normale; 3° un fin cercle brun, net, bien visible; 4° la culture normale. Ces caractères sont stables et se reproduisent au cours de tous les passages. Cet aspect est surtout net si la plaque est maintenue à l'étuve à 30°-32°. Il peut faire défaut ou être difficilement perceptible si la plaque a été incubée à 37°.

b) *Principes anti-SR*. — Les 6 principes *anti-SR* et les 6 principes *anti-RS* éprouvés aux dépens du type *S* produisent uniquement de petites plages. Celles des principes *SVII* sont les plus grandes : elles peuvent atteindre 3 millimètres. Celles des principes *SXI*, *SXV* et *R XV* sont les plus petites : 1 millimètre environ. Toutes ont des pourtours nets réguliers. Les plages des principes *SVII a* et *c*, *SIX* et *SXI* sont entourées d'un très fin liséré brun. Les plages des autres principes sont entourées d'un liséré plus large, mais ne dépassant jamais 1 millimètre.

Exception faite des principes *SIX*, *SXVa* et *RVIII*, les principes *anti-SR* et *anti-RS* éprouvés aux dépens du type *R* produisent tous de 1 à 3 millimètres de diamètre. Elles ont toutes un pourtour irrégulier, rongé. Le liséré brun qui les entoure est très net, sauf pour les plages des principes *SVII* et *SXI*. Comme nous l'avons déjà signalé plus haut, les principes

SIX et XXV, qui lysent le type *S* à haute dilution ($1-8$ à $1-11$), n'agissent sur le type *R* qu'à l'état concentré (pur à $1-4$). Ils ne donnent pas lieu à la formation de plages aux dépens du type *R*, mais la culture soumise à leur influence présente des taches grises, vitreuses, caractéristiques, qui peuvent être confluentes si le principe est employé à l'état pur (1).

Au niveau de ces taches, le gazon microbien est visqueux, filant, comme on peut s'en rendre compte en le touchant du bout du fil de platine. Les principes *anti-S* étudiés plus haut ne reproduisent jamais cette transformation. La virulence pour *R* de ces deux principes peut être facilement exaltée, de façon à obtenir de vraies plages par passages aux dépens du type *S* en présence du type *R*.

Le principe *R* VIII éprouvé vis-à-vis de *R* donne des plages qui peuvent atteindre 5 millimètres, mais la lyse n'est jamais complète à leur périphérie.

c) *Principe anti-R*. — Le seul principe *anti-R* que nous possédons donne des plages de 2 à 5 millimètres de diamètre. Elles présentent un aspect spécial du fait que la lyse n'est complète qu'au centre, la périphérie étant couverte de culture partiellement lysée. Cette caractéristique persiste même après 12 passages aux dépens du type *R*.

CONCLUSION. — Sauf les deux principes *S* VIII, tous les principes *anti-S* isolés sont des principes à grandes plages à pour-tours nets. Aucun de ces principes actifs pour *S* et pour *R* ne donne de grandes plages avec le type *S*; un seul de ces principes (*R* VIIa) agit sur *R* en donnant des plages de moyenne grandeur. Tous les autres n'en donnent que de petites. Les caractères des plages d'un principe donné sont stables.

2° RÉSISTANCE A LA TEMPÉRATURE. — Les 20 principes dilués au $1/10$ dans de l'eau salée à 7 p. 1.000 sont chauffés au bain-marie durant une demi-heure dans des ampoules scellées complètement submergées. La persistance ou la destruction du bactériophage est recherchée par étalement sur gélose ense-

(1) Nous nous sommes assuré encore une fois, par une nouvelle série de sélections de plages isolées, qu'il s'agissait bien de principes purs et non d'un mélange de bactériophages différents.

mencée d'*Hiss S* ou *R* (selon qu'il s'agit de bactériophage *S* ou *R*), d'une anse du liquide chauffé. Ajoutons que les filtrats non chauffés sont tous actifs à des dilutions de $1-9$ à $1-11$ et que les différences trouvées dans la résistance à la température ne peuvent pas s'expliquer du fait que les filtrats sont plus ou moins concentrés. Pareillement, il n'y a aucune concordance entre la résistance à la température et le nombre de passages aux dépens du bacille de Hiss qu'a subis chaque principe avant d'être chauffé.

Nous donnons dans le tableau III les résultats de ces expériences :

TABLEAU III. — Résistance à la température des différents principes.

	NON CHAUFFÉ	60°	62°	64°	66°	68°	70°	72°
<i>S VIII a</i> . . .	+++	+++	+++	++	2	—		
<i>S VIII b</i> . . .	+++	+++	+++	+	1	—		
<i>S X a</i> . . .	+++	+++	++	—				
<i>S X b</i> . . .	+++	+++	++	—				
<i>S XI a</i> . . .	+++	+++	+	—				
<i>S XIII a</i> . . .	+++	+++	+	—				
<i>S XIII b</i> . . .	+++	+++	+					
<i>S VII a</i> . . .	+++	+++	+++	+++	++	60	—	
<i>S VII c</i> . . .	+++	+++	+++	+++	++	+	—	
<i>S IX a</i> . . .	+++	++	+	—	—			
<i>S XI b</i> . . .	+++	+++	++	+				
<i>S XI c</i> . . .	+++	+++	+++	+++	200	—		
<i>S XV a</i> . . .	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—
<i>R VII a</i> . . .	+++	+++	++	9	2	—		
<i>R VIII a</i> . . .	+++	+	3	—				
<i>R X a</i> . . .	+++	+++	++	+	—	—		
<i>R XI a</i> . . .	+++	+++	++	120	60	—		
<i>R XIII a</i> . . .	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	—
<i>R XV a</i> . . .	++	+++	12	—				
<i>R XV b</i> . . .	+++	+	9	—				

+++ , pas de culture; ++ , traces de culture; + , plages confluentes. Les chiffres se rapportent au nombre de plages.

Des expériences de contrôle ont constamment fourni des résultats identiques. Manavutty [21] dernièrement a insisté sur la grande différence de sensibilité à la température d'un même principe selon qu'il est suspendu dans de l'eau salée, dans une solution de phosphate ou dans son propre filtrat préalablement inactivé par ébullition.

Les différences de résistance à la température trouvées plus haut pourraient être attribuées, du moins en partie, au fait que certains filtrats seraient plus riches que d'autres en corps bacillaires dissous. Pour exclure ce facteur, nous avons fait l'expérience suivante :

Le principe SXIII est dilué au 1/50 : 1° dans de l'eau salée ; 2° dans son propre filtrat inactivé par chauffage d'une heure à 80° ; 3° dans le filtrat inactivé du principe SVII. Celui-ci est traité de façon analogue, c'est-à-dire que, pour le *tertio*, il est dilué dans le filtrat inactivé du principe SXIII. Le chauffage de ces différentes suspensions — ou solutions — a montré que la susceptibilité à la température des principes SXIII et SVII n'est pas ou à peine influencée par la nature du milieu ambiant : qu'ils soient suspendus dans de l'eau salée, dans leur propre filtrat ou dans le filtrat de l'autre principe, leur point d'inactivation ne varie pas : il se maintient respectivement à 64° et à 70°.

CONCLUSION. — A part les deux principes SVIII, tous les principes *anti-S* présentent la même sensibilité à la température : ils sont détruits à 64°. Par contre, les principes *anti-SR* sont inactivés à des températures variables d'un principe à l'autre. Certains ne sont détruits qu'à 72° ; d'autres déjà à 64°. Entre ces deux extrêmes existent tous les intermédiaires possibles.

REMARQUE. — Hadley [14] trouva également que son principe α , qui agit électivement sur le type *S*, était plus sensible à la température que son principe β qui lyse plus spécialement le type *R* et fait remarquer à ce propos que précisément l'antigène *S* est thermolabile alors que l'antigène *R* est thermostable. Nos résultats ne confirment pas l'existence d'une pareille relation entre la résistance à la température des bactériophages et celle de l'antigène du type microbien sur lequel ils agiraient. Si nos principes *anti-S* sont tous plus sensibles que nos principes *anti-SR*, ceux-ci, par contre, présentent des points d'inactivation variables, et, considérés dans leur ensemble, ne sont pas plus résistants du fait qu'ils sont entretenus aux dépens du type *R* plutôt que du type *S*.

3° CARACTÈRE ANTIGÉNIQUE. — 8 lapins sont immunisés au moyen de 8 bactériophages différents (3 principes *anti-S*, 2 principes *anti-SR*, 2 principes *anti-RS*, 1 principe *anti-R*). Chaque lapin reçoit de 8 à 10 injections intraveineuses de 4 à 6 cent. cubes de filtrat actif à $1-9$ au moins.

TABLEAU IV. — Résultats des essais de neutralisation des 20 principes par divers sérums.

ANTI-SÉRUM	PRINCIPES <i>anti-S</i>			PRINCIPES <i>anti-SR</i>				PRINCIPES <i>anti-R</i>	
	<i>S VIII a</i>	<i>S X a</i>	<i>S XI a</i>	<i>R VII a</i>	<i>R X a</i>	<i>S VII a</i>	<i>S XI b</i>	<i>R XV b</i>	
<i>Principes anti-S :</i>									
<i>S VIII a</i> . .	—	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S VIII b</i> . .	—	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>S X a</i> . . .	+	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>S X b</i> . . .	+	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>S XI a</i> . . .	+	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>S XIII a</i> . .	+	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>S XIII b</i> . .	+	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>Principes anti-SR ou RS :</i>									
<i>S VII a</i> . .	+	+	+	+	+	—	+	+	+
<i>S VII c</i> . .	+	+	+	+	+	—	+	+	+
<i>S IX a</i> . . .	+	+	+	+	+	—	+	+	+
<i>S XI b</i> . . .	+	+	+	—	—	+	—	+	+
<i>S XI c</i> . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S XV a</i> . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R VII a</i> . .	+	+	+	—	—	+	—	+	+
<i>R VIII a</i> . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R XI a</i> . . .	+	+	+	—	—	+	—	+	+
<i>R X a</i> . . .	+	+	+	—	—	+	—	+	+
<i>R XIII a</i> . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R XV a</i> . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Principes anti-R :</i>									
<i>R XV b</i> . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+

—, absence de lyse ; +, lyse complète.

Les expériences de neutralisation sont faites de la manière suivante : chacun des 20 principes (tous actifs à la dilution de $1-9$ à $1-11$) est mélangé, à volume égal, avec chacun des 8 sérums. Après vingt-quatre heures de contact à la température du laboratoire, une anse de chacun des mélanges est déposée, puis légèrement étendue sur gélose ensemencée,

a près évaporation du liquide, d'une anse de *Hiss S* ou *R*, selon qu'il s'agit d'un filtrat *S* ou *R*.

Nous donnons le résultat de cette expérience dans le tableau IV. Elle fut répétée pour la plupart des bactériophages avec des résultats identiques.

CONCLUSION. — A part les deux principes *SVIII*, tous les bactériophages *anti-S* sont sérologiquement identiques : les 2 sérums *anti-S Xa* et *anti-S XIa* ne neutralisent pas seule-

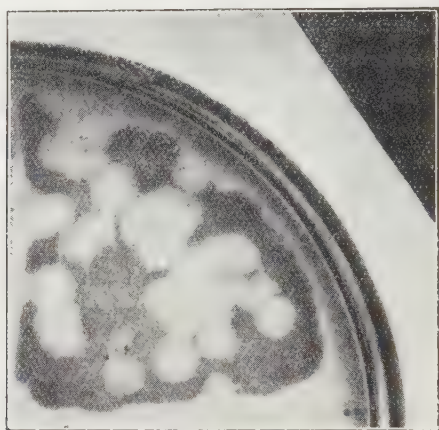


FIG. 1. — Principe *S Xa*. Grandes plaques.

ment ces deux principes, mais également tous les autres principes *anti-S*. Aucun des 3 sérums *anti-S* n'a d'action sur les principes *anti-SR* ou *anti-R*. Les 4 sérums préparés au moyen des 4 bactériophages *anti-SR* sont, par contre, différents entre eux : chacun neutralise celui qui a servi à sa préparation et seulement un à trois autres principes *anti-SR*. Aucun n'a d'action sur les principes *anti-S*. Les principes *anti-SR* sont donc sérologiquement presque tous différents entre eux.

REMARQUE. — 1° Le sérum préparé contre le principe *SXVb* (principe *anti-R*) s'est montré totalement inactif malgré des injections répétées au lapin.

2° Gratia a également constaté des différences antigéniques

entre les bactériophages à grandes et petites plages pour le *B. coli*. Le sérum *anti-grandes plages* neutralisait toutes les grandes plages et une partie des petites; le sérum *anti-petites plages* neutralisait toutes les petites plages et une partie des grandes. Donc, quoique différents, il existait une certaine parenté antigénique entre les principes à grandes et à petites plages. La méthode employée dans nos expériences de neutralisation ne permet pas de mettre une pareille parenté en évidence. Nous aurions peut-être pu la constater en ajoutant, à une série de même doses de sérum *anti-S*, des doses décrois-

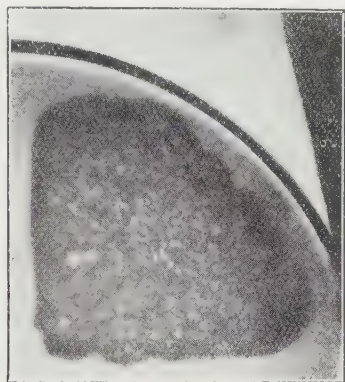


FIG. 2. — Principe S VIIIa.

santes de principe *anti-SR*. Nous ne l'avons pas fait jusqu'ici : le but visé dans nos expériences est de montrer que les principes *anti-S* et *anti-SR* sont sérologiquement distincts; nos résultats ne laissent pas le moindre doute à ce sujet.

DISCUSSION. — Bordet, le premier, montra qu'il y avait lieu d'établir une distinction entre certains principes selon leur action sur les colonies bombées ou plates du *B. coli*. Mais cette distinction n'était pas nette : les principes « forts » qui lysaient la forme bombée aussi bien que la forme plate pouvaient être facilement transformés en principes « faibles », ceux-ci lysaient le type *S* à haute dilution, mais également le type *R* s'ils étaient employés à concentration élevée. D'autre part, les principes faibles peuvent reproduire dans certaines conditions

du principe fort. Enfin, entre les principes forts et les principes faibles existaient tous les intermédiaires possibles. Les recherches de Gratia confirmèrent celles de Bordet. Elles amenèrent, en outre, l'auteur à individualiser davantage les principes forts et les principes faibles. Les premiers sont essentiellement des principes à petites plages, plus résistants au chauffage que les seconds qui sont des principes à grandes plages; en plus, ils se distinguent sérologiquement et lysent chacun la culture secondaire résistante engendrée sous l'influence de l'autre. Toutefois, d'après les recherches de Gratia, les principes forts peuvent se

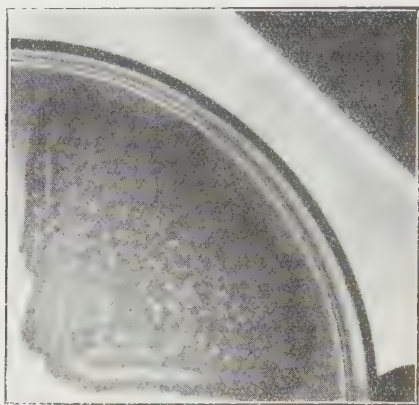


FIG. 3. — Principe S XIb. Petites plages.

transformer en principes faibles et, si les principes à petites plages sont stables, ceux à grandes plages reproduisent un mélange de bactériophages à grandes et à petites plages. Il n'était donc pas permis de classer comme entièrement différents les principes forts et faibles, les principes à grandes et à petites plages. Hadley et ses collaborateurs étudièrent les principes à grandes plages et à petites plages pour les bacilles paratyphiques A et B. Ils les appelèrent principes α et β , mais leur principe α , tout comme le principe à grandes plages de Gratia, était instable et il arrivait qu'il se transformait au cours des passages successifs presque entièrement en principe β . De plus — et ceci ne cadre pas avec les expériences de Bordet et de Gratia — ils lysaient tous deux le type S et le type R, avec

cette différence que la zone périphérique des plages données par le principe α était différente selon qu'il agissait sur l'un ou l'autre de ces types.

Dans ce travail nous sommes arrivé à grouper comme entièrement distincts les principes *anti-Hiss*, selon qu'ils lysaient uniquement le type *S* ou le type *R* ou qu'ils s'attaquaient aux deux. Nous disons « entièrement distincts » parce que : 1° il nous a été impossible de transformer les bactériophages d'un de ces groupes en un bactériophage d'un autre groupe; 2° outre leur rayon d'action, les principes *anti-S* et *anti-SR* se différencient par un ensemble d'autres caractéristiques. Mis à part les 2 principes *SVIII*, tous les principes *anti-S* isolés sont des principes à grandes plages; ils sont tous inactivés à la même température et sont tous semblables sérologiquement. Ils nous apparaissent tous comme identiques. Les deux principes *SVIII*, par l'aspect de leurs plages ainsi que par leurs autres caractères, appartiennent à un type spécial. Ce sont les seuls bactériophages *anti-S* rencontrés, dont les caractéristiques s'écartent de celles invariablement communes aux 5 autres principes *anti-S*. Par contre, les principes *anti-SR* forment un groupe tout à fait hétérogène : ils diffèrent presque tous entre eux, soit par l'aspect de leurs plages, leur sensibilité à la température ou leurs caractères sérologiques. Leur seule caractéristique commune est leur rayon d'action.

N'étant parvenu à isoler qu'un seul principe *anti-R*, il nous est impossible d'insister sur leurs caractéristiques générales. Nos principes *anti-S* se distinguent essentiellement des principes faibles de Bordet, du fait que ceux-ci lysent le type *R* s'ils sont employés à haute concentration et peuvent y être adoptés. A ce point de vue, nos principes *SIXa* et *SXVa* (principes *anti-SR*) répondent à la description de principe faible, mais ils ne reproduisent que de petites plages, alors que les principes faibles sont des principes à grandes plages. Peut-être la différence constatée dans le rayon d'action entre les principes faibles de Bordet et nos principes *anti-S* est-elle due au mode d'obtention du type *R*. Bordet sélectionne, dans une culture de stock, une colonie à aspect *R*, alors que nous l'obtenons aux dépens du type *S* par des passages dans le bouillon contenant du sérum *anti-Hiss S*. Le type *R* ainsi obtenu pourrait être privé

plus complètement d'antigène *S*. Enfin, il est possible qu'une distinction nette entre principes *anti-S* et *anti-SR* s'établisse pour le bacille de *Hiss* et non pour le *B. coli*.

En concordance avec les résultats de Kline [22] pour le bacille typhique, nous n'avons que rarement constaté la protection de petites plages aux dépens d'un principe à grandes plages, et alors il ne s'agissait jamais de « vrai » principe à petites plages. Nous renvoyons à ce sujet à ce que nous avons dit plus haut. Nous ignorons si la transformation de grandes en petites plages, constatée par différents auteurs, est à rattacher à un phénomène de ce genre, ou s'il s'agit réellement d'une transformation du principe *anti-S* en principe *anti-SR*.

La classification des principes *anti-Hiss* en *anti-S*, *anti-SR* et *anti-R*, nous paraît parfaitement justifiée; elle conduit à la création de groupes bien distincts. Nous croyons qu'il serait intéressant de rechercher si cette classification ne pourrait pas être étendue aux principes actifs pour d'autres espèces microbiennes. Les dernières recherches de Gratia laissent supposer qu'elle se vérifiera avec autant de netteté pour les bactériophages anti-staphylococciques.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

1° Les bactériophages actifs pour le bacille de *Hiss* peuvent être classés en principes ne lysant que le type *S*, en principes ne lysant que le type *R* et en principes lysant les deux types. Ces divers groupes sont stables.

2° A part les deux principes *S VIII*, tous les principes *anti-S* isolés sont des principes à grandes plages, détruits à 64° et tous identiques antigéniquement. Ils constituent un groupe homogène;

3° Les principes *anti-SR* isolés sont presque tous différents entre eux, comme le montrent l'aspect de leurs plages, leur résistance à la température et leurs caractères antigéniques. Ils constituent un groupe hétérogène;

4° Ces expériences démontrent encore, si besoin en est, la pluralité et l'autonomie des bactériophages.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRUYNOGHE. *Soc. Biol.*, **86**, 1922, p. 733; *Soc. Biol.*, **87**, 1922, p. 96.
- [2] GRATIA et DE NAMUR. *Soc. Biol.*, **87**, 1922.
- [3] BAIL. *Wien. kl. Wochenschr.*, n° 46, 1921 et n° 35, 1922.
- [4] WATANABÉ. *Zeitschr. f. Immun. und exp. Th.*, 37, 1922.
- [5] ASHEHOW. *Soc. Biol.*, 87, 1922.
- [6] BAIL. *Zeitschr. f. Im. exp. Th.*, 38, 1923.
- [7] BORDET et CIUCA. *Soc. Biol.*, 87, 1922.
- [8] BRUTSAERT. *Soc. Biol.*, 1923.
- [9] GRATIA et DE KRUIF. *Soc. Biol.*, 1923.
- [10] GRATIA. *Soc. Biol.*, **89**, 1923, p. 821 et 824.
- [11] MC KINLEY. *Soc. Biol.*, 1923.
- [12] HADLEY. *J. Bacteriology*, 1924.
- [13] HADLEY et DABNEY. *Proc. soc. exper. B. and Med.*, 1928.
- [14] HADLEY. *J. of Inf. Dis.*, **42**, 1928.
- [15] BURNET. *J. of Path. and Bact.*, 1929.
- [16] BURNET et MC KIE. *J. of Path. and Bact.*, 1930.
- [17] GRATIA. *Soc. Biol.*, 1931.
- [18] BORDET. *Proc. of the R. Soc.*, vol. CVII, 1921.
- [19] ARKWRIGHT. *J. of Path. and Bact.*, **24**, 1921.
- [20] KOSER et STYRON. *J. of Inf. Dis.*, 1930.
- [21] MANAVUTTY. *J. of Path. and Bact.*, vol. XXXIII, 1930.
- [22] KLINE. *J. Am. Publ. H.*, **12**, 1927.

LE SÉRO-DIAGNOSTIC DE WRIGHT CHEZ LA BREBIS ATTEINTE DE MÉLITOCOCCIE DANS LA PÉRIODE QUI SUIT L'AVORTEMENT

par
le Dr Ch. DUBOIS, et le Dr N. SOLLIER,
Directeur chef des Laboratoires
des Services vétérinaires du Gard. des Hôpitaux de Nîmes.

Dans un premier mémoire sur la séro-agglutination de Wright chez la chèvre et la brebis (1), nous avons montré que

TABLEAU I. — Taux des agglutinations

NUMÉRO des brebis	NOMBRE DE																
	1	2	4	6	7	8	9	11	12	13	14	15	17	18	20	21	
3	0		1/10				1/50				1/30				1/20	1/20	
5				0				0			0			0			
16						0				1/100				0			
17					0				1/100				1/50				
18		0				0				1/30				1/10			
19												1/30					

cette réaction était inconstante et qu'elle pouvait faire défaut chez des animaux sûrement atteints de mélitococcie. Nous nous étions alors donné pour tâche d'étudier, en particulier, le séro-diagnostic au cours de l'infection naturelle.

L'objet du présent mémoire est de compléter ces premières recherches par l'étude de cette réaction dans les jours qui suivent l'avortement, en vue de préciser, si possible, dans un but d'intérêt pratique, le moment le plus favorable à la révélation des propriétés agglutinantes du sang.

(1) Ch. DUBOIS et N. SOLLIER, Sur les variations des résultats de la séro-agglutination et de l'hémoculture dans la mélitococcie ovine et caprine au cours de l'infection expérimentale et naturelle. Ces *Annales*, 47, juillet 1931, p. 73.

Notre expérimentation a été faite dans les conditions ci-après indiquées.

Une vingtaine de brebis de race caussenarde, âgées d'un an environ, n'ayant jamais porté et indemnes de mélitococcie (1), sont introduites, en mai 1931, dans un troupeau de brebis appartenant au sieur S..., au Mas Galoffre, à Nîmes, où depuis plus d'un an sévit cette maladie (2 cas de fièvre ondulante, avortements multiples et nombreux séros de Wright positifs chez les animaux).

Au bout de quelque temps, on introduit les béliers dans le troupeau. La plupart des 20 brebis ont été fécondées et, à partir d'août, des avortements ont été constatés, dont la date a été soigneusement notée.

Notre expérimentation a porté sur 6 de ces brebis qui avaient

période qui a suivi l'avortement.

S L'AVORTEMENT

28	29	31	32	35	36	39	40	50	51	52	53	55	58	62	78	79
1/30 0				0												
1/50	1/30	1/50	1/50	1/100	1/20				1/30	1/30 0	1/10					
	1/30		1/50	0	1/20					1/30	0					
						1/30	0	1/30				1/20	0	1/10	1/10	1/30

avorté (2). Des prélèvements de sang ont été effectués sur celles ci, en moyenne tous les cinq à six jours, depuis l'avortement jusqu'à plus de deux mois après cet accident.

Le tableau n° 1 indique, pour chacun de ces animaux, les résultats fournis par le séro-diagnostic de Wright dans les jours qui ont suivi l'avortement.

N'ont été considérées comme positives que les agglutinations qui se produisaient, d'une façon complète, macroscopiquement, aux taux minima de 1/30 en moins de douze heures

(1) Ont toutes présenté un séro de Wright négatif à deux reprises, à quinze jours d'intervalle.

(2) Dates de l'avortement : Brebis n° 19, avortée le 6 août 1931; n° 16, le 2 septembre; n° 18, le 2 septembre; n° 17, le 3 septembre; n° 5, le 19 septembre; n° 3, le 3 octobre.

et de 1/50 en moins de vingt-quatre heures. Mais, pour chaque sang examiné, la réaction a été effectuée aux taux de 1/10, 1/20, 1/30, 1/50, 1/100, 1/200.

De l'examen du tableau I, résultent les constatations suivantes :

1° Le séro-diagnostic est constamment négatif dans les huit jours qui suivent l'avortement;

2° Le plus grand nombre d'agglutinations positives est constaté du neuvième au quinzième jour chez la plupart des animaux; ensuite, ce nombre diminue;

3° Un animal, bien que sûrement infecté, peut présenter, en permanence, des séros négatifs (brebis n° 5) ou seulement par intermittences (brebis n° 3, 16 et 18). Du jour au lendemain, chez le même animal, un séro positif devient négatif et *vice versa*.

Ces résultats confirment ceux de même ordre que nous avons déjà signalés (1). Ils impliquent, comme nous l'avons dit, la nécessité de renouveler les examens de sang chez les ovins suspects.

Ces constatations viennent à l'encontre de celles qui ont été faites chez les vaches atteintes d'avortement épizootique d'origine brucellique. Chez celles-ci, on sait, en effet, que les résultats du séro-diagnostic de Wright sont plus constants et que, notamment, à condition de faire des prélèvements du *quinzième au trentième jour après l'avortement*, on obtient, presque à coup sûr, des résultats positifs.

. . .

D'autre part, nous avons recherché chez les mêmes brebis ayant avorté si, dans la même journée, selon que l'on prélèverait le sang dans l'état de jeûne ou pendant la période digestive, on n'observerait pas de différences dans le taux de l'agglutination.

Dans ce but, à deux reprises nous avons fait les expériences suivantes :

Une première fois, le 7 octobre 1931, les animaux étant à

(1) Ch. DUBOIS et N. SOLLIER. Ces *Annales*, déjà cité.

jeun depuis quatorze heures, nous avons fait un premier prélèvement de sang à 8 heures; ceux-ci étaient, aussitôt après, alimentés et, à 12 heures, en pleine période digestive, un deuxième prélèvement était effectué.

Dans une deuxième expérience, faite le 23 octobre, des prélèvements ont été effectués à 8 heures, les brebis étant à jeun depuis seize heures, puis à 12 heures, pendant la digestion, puis à 18 heures, après un deuxième repas, donc en période digestive, enfin, encore le lendemain matin, à 8 heures, après un nouveau jeûne de seize heures. Les résultats de ces deux expériences sont consignés dans le tableau II.

TABLEAU II.

NUMÉROS des brebis	PREMIÈRE EXPÉRIENCE			DEUXIÈME EXPÉRIENCE				24 OCTOBRE 8 heures à jeun
	Nombre de jours après l'avortement	7 octobre		Nombre de jours après l'avortement	23 octobre			
		8 heures animal à jeun	12 heures animal en état de digestion		8 heures à jeun	12 heures en état de digestion	18 heures en état de digestion	
3	4 ^e	0	1/10	20 ^e	0	1/20	1/20	1/20
5	18 ^e	0	0	34 ^e	0	0	0	0
16	36 ^e	0	1/20	52 ^e	1/10	1/30	1/20	1/10
17	35 ^e	1/30	1/100	54 ^e	1/20	1/20	1/30	0
18	36 ^e	0	1/20	55 ^e	0	1/30	1/10	0
19	62 ^e	1/10	1/20	78 ^e	0	0	1/10	1/30

Ainsi donc, au cours de la même journée, on observe des variations du taux de l'agglutination. C'est ainsi qu'un prélèvement négatif la veille peut être positif le lendemain.

Il semble bien, en outre, que c'est au moment de la digestion que l'on a le plus de chance, à la fois, de trouver des séros positifs et des taux d'agglutination élevés. L'état de digestion paraîtrait donc favoriser la révélation des propriétés agglutinantes du sang.

CONCLUSIONS.

1° Ces nouvelles recherches confirment et complètent les conclusions que nous avions exposées dans notre premier

mémoire touchant l'inconstance et la variabilité des résultats du séro-diagnostic de Wright au cours de la mélitococcie ovine ;

2° Le séro-diagnostic est constamment négatif dans les huit jours *qui suivent l'avortement* chez les brebis infectées ;

3° La période optimum pour effectuer les prélèvements de sang paraît être comprise surtout entre le neuvième et le quinzième jour ;

4° Il paraît recommandable de prélever le sang pendant la période de digestion plutôt que pendant la période de jeûne, la première permettant d'obtenir, semble-t-il, des taux d'agglutination plus élevés.

ÉTUDES SUR LA PESTE BOVINE

par H. JACOTOT

(PREMIÈRE PARTIE)

RECHERCHES SUR LE VIRUS DE LA PESTE BOVINE ET SUR L'INFECTION QU'IL DÉTERMINE

Sur la conservation du virus.

Les premiers chercheurs qui se sont attachés à l'étude de la peste bovine se sont rapidement convaincus de la fragilité du virus causal, hors de l'organisme surtout; il est par exemple de notion courante que, même sous un certain volume, le sang provenant d'animaux atteints de peste ne reste virulent que pendant quelques jours lorsqu'on le conserve à la température du milieu aux Colonies (soit vers 30°), et pendant deux ou trois semaines lorsqu'on le maintient à la température de 0°; le chauffage à 55° détruit sa virulence en trente minutes; la dessiccation agit dans le même sens en un à trois jours.

En raison de l'intérêt théorique et pratique de cette question, nous nous sommes efforcé, au cours de nos études sur la peste bovine, de rechercher s'il ne serait pas possible de retarder de façon appréciable la mort du virus en dehors de l'organisme; nous avons effectué ainsi un certain nombre de tentatives avec des humeurs virulentes, sang et liquide péritonéal, en mettant en œuvre divers artifices expérimentaux; et, d'autre part, pensant que le virus inclus dans les organes, fixé sur certains éléments anatomiques de ces organes, diffère quelque peu de celui qu'on trouve dans les humeurs, nous avons essayé de le conserver par divers procédés. Nous exposerons celles de ces expériences qui ont donné des résultats intéressants.

ESSAIS DE CONSERVATION DU VIRUS DANS LE SANG.

On sait que, dans l'organisme sain, le sang est doué d'un pouvoir bactéricide élevé qui lui permet de s'opposer, pendant un temps au moins, à l'invasion des germes infectieux. On a constaté en outre qu'il suffisait d'abaisser le pH du sang jusqu'à une réaction acide pour annihiler son pouvoir bactéricide (1).

Il nous a paru intéressant de rechercher si la destruction du pouvoir bactéricide du sang recueilli sur des veaux atteints de peste bovine ne favoriserait pas la survie du virus pestique dans le liquide. Ne disposant pas du matériel nécessaire à l'évaluation rapide et précise du pH sanguin, nous avons procédé de la manière suivante : nous avons établi de façon approximative, par colorimétrie et en employant des solutions titrées, les quantités de soude ou d'acide chlorhydrique qu'il fallait ajouter au sang pour l'amener au pH voulu; immédiatement après la récolte, le sang était défibriné; on l'acidifiait ensuite par addition d'acide chlorhydrique au 1/50 pour l'amener à pH 6; quinze minutes après on ramenait à pH 7,5 par addition de soude au 1/15; toutes ces opérations, pour être rigoureuses, nécessiteraient une technique perfectionnée; les moyens de fortune que nous avons employés ne nous ont permis qu'une approximation grossière; nous avons pu néanmoins, par ce moyen, conserver au sang sa virulence bien au delà des délais ordinaires.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — On conserve à la température ordinaire (30°), et dans l'obscurité, 60 cent. cubes de sang préparé de la manière indiquée, et 60 cent. cubes de sang témoin.

Après un mois, on inocule à un veau, n° MO, 10 cent. cubes du sang préparé et à un autre veau, n° 830, 10 cent. cubes du sang témoin; le premier contracte la peste, le deuxième reste indemne; réinoculé ultérieurement avec du sang virulent il contractera la maladie.

Remarque. — Nous avons en outre placé dans l'étuve, à 37°, 60 cent. cubes du sang préparé.

Après trois jours et demi, on en injecte 1/10 de centimètre cube à un veau n° D-829; il fait une peste mortelle.

(1) Voir L. BOEZ : Influence du pH sur le pouvoir bactéricide du sang. *C. R. Soc. de Biol.*, 1929, p. 848.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — On conserve du sang préparé et du sang témoin comme dans la première expérience; après un mois un veau n° RT reçoit 5 cent. cubes de sang préparé, un autre veau n° RS 5 cent. cubes de sang témoin; le premier fait la peste, le second reste indemne et contractera la maladie ultérieurement lors de l'épreuve de contrôle.

Après deux mois un veau, n° E-624, reçoit sous la peau 5 cent. cubes de sang préparé; il reste indemne; on l'éprouve quelque temps après avec du sang virulent et il fait alors la peste.

TROISIÈME EXPÉRIENCE. — On prépare du sang comme il a été dit plus haut, mais le sang témoin est divisé en deux parties, l'une qu'on conservera à la température du milieu (30°), l'autre qu'on place dans la glacière à la température de 0°.

Après un mois, on injecte au veau n° E-696 10 cent. cubes de sang préparé, au veau n° E-616 10 cent. cubes du sang témoin conservé à la température de 30°, au veau n° D-947 5 cent. cubes du sang témoin conservé à la température de 0°. Le premier contracte la peste, les deux autres restent indemnes et réceptifs.

Après un mois et demi, on répète cette expérience en injectant uniformément aux sujets 20 cent. cubes de sang; aucun ne manifeste de troubles et tous trois réagissent à l'épreuve de contrôle.

Ainsi dans ces trois expériences, et contrairement au sang témoin, le sang préparé par destruction du pouvoir bactéricide était encore virulent après un mois de conservation à la température de 30° dans l'obscurité (deux fois à la dose de 10 cent. cubes, une fois à la dose de 5 cent. cubes). On peut penser que les résultats seraient encore meilleurs si les manipulations ayant pour objet la destruction du pouvoir bactéricide étaient conduites avec plus de rigueur que nous n'avons pu le faire.

ESSAIS DE CONSERVATION DU VIRUS DANS LE LIQUIDE DE LAVAGE PÉRITONÉAL.

Le liquide de lavage péritonéal préparé par injection de sérum physiologique dans le péritoine est pauvre en unités virulentes (25 à 50 par centimètre cube), et, après la récolte, il perd très rapidement sa virulence.

Nous nous sommes demandé s'il ne serait pas possible d'obtenir un liquide de virulence moins fragile en substituant au sérum physiologique du sérum formolé préparé suivant la formule de Legroux; ce sérum formolé, qui donne d'excellents résultats dans la conservation des germes microbiens figurés, paraît se comporter comme un liquide-tampon et nous pen-

sions, en l'utilisant, réaliser quelque chose d'analogue à ce que nous avons obtenu en neutralisant le pouvoir bactéricide du sang. Voici les deux expériences que nous avons faites :

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — On choisit 2 veaux préalablement inoculés avec du sang virulent, et au septième jour de la maladie on injecte dans la cavité péritonéale de l'un 3 litres de sérum physiologique, et 3 litres de sérum formolé dans la cavité péritonéale de l'autre. Quatre heures après on recueille les deux liquides (1 lit. 1/2 de chacun) et on les répartit dans des ampoules de 5 cent. cubes qu'on place dans une glacière à une température de 8-10°.

Après dix-huit jours, on injecte par voie sous-cutanée au veau n° ZJ 5 cent. cubes de sérum formolé de lavage, et au veau n° ZH 5 cent. cubes de sérum physiologique de lavage; le premier fait la peste après une période d'incubation de quinze jours, le deuxième reste indemne et réceptif.

Après cinquante jours on renouvelle les injections en doublant la quantité des liquides, mais sans résultat cette fois, même avec le sérum formolé.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — On procède comme dans l'expérience précédente.

Une semaine après la récolte, on injecte 1 cent. cube de sérum formolé de lavage au veau n° E-779 et 1 cent. cube de sérum physiologique au veau n° ADJ. Le premier contracte la peste (incubation de une semaine), le second reste indemne et réceptif.

Quinze jours après la récolte on répète les injections des mêmes quantités de liquides sans aucun résultat.]

Ainsi, après lavage péritonéal, le sérum formolé, conservé à la température de 10°, s'est montré virulent à la dose de 10 cent. cubes, dix-huit jours après la récolte dans la première expérience, et à la dose de 1 cent. cube une semaine après la récolte dans la deuxième expérience; dans les mêmes conditions, le sérum physiologique employé comme témoin avait déjà perdu sa virulence.

ESSAIS DE CONSERVATION DU VIRUS

INCLUS DANS CERTAINS TISSUS.

Une constatation qu'ont pu faire tous les expérimentateurs qui ont étudié le nouveau vaccin antipestique à base d'extraits organiques, c'est que, tandis que certains tissus conviennent parfaitement à la préparation de ce vaccin, il est à peu près impossible de le préparer à partir du sang, du liquide péritonéal, et, d'une manière générale, des humeurs; cela conduit à penser qu'il existe quelque différence entre le virus pestique

tissulaire et le virus pestique humoral; parlant de cette hypothèse, nous nous sommes proposé d'étudier l'aptitude des tissus à rester virulents en dehors de l'organisme.

1° Conservation du virus dans les tissus bruts.

Nous avons fait deux expériences avec la pulpe splénique et deux avec des fragments de thymus.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE (pulpe splénique). — Un veau n° 435-D, inoculé de peste bovine, est sacrifié cinq jours après (2 septembre 1929); on prélève la rate, la fragmente avec des ciseaux, broie les fragments au hache-viande, passe enfin le hachis au travers d'un tamis métallique à mailles de 5/10 de millimètre. On recueille sous le tamis une pulpe fine qu'on répartit sous cette *forme brute* dans des tubes stériles. Ces tubes sont fermés par des bouchons, puis lutés à la paraffine; on les place dans une bouteille « thermos » qu'on remplit de glace pilée; cette bouteille est elle-même déposée dans une glacière à la température de 10°; on pourra ainsi n'y remettre de la glace que 2 fois par semaine. La température de la pulpe après égalisation se maintient à 0°.

Depuis ce moment, 7 essais de virulence ont été effectués, chaque fois par injection à un veau sensible de 1 gramme de pulpe délayée extemporanément dans 9 cent. cubes d'eau physiologique; tous les essais ont donné un résultat positif jusqu'au sixième inclusivement et cet essai a été fait sept mois après la récolte de la pulpe splénique (veaux n° 14, LE, ME, MR, OF, SL); au septième essai, pratiqué deux mois plus tard, le sujet n'a pas été infecté (veau n° VA) et, réinoculé ultérieurement avec 2 cent. cubes de sang virulent, il a fait une peste ordinaire.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE (pulpe splénique): — On prépare de la manière indiquée plus haut les rates des veaux n° N-1 et n° N-2, sacrifiés le 14 avril 1930, cinquième et sixième jours de la maladie.

On mélange les pulpes et les dispose comme précédemment pour que leur température se maintienne à 0°.

Dans cette expérience, les essais de virulence ont été positifs jusqu'au cinquième mois inclus (veaux n° E-707, YG, ABY); l'inoculation suivante, effectuée après sept mois, est restée sans résultat; le veau qui n'avait pas réagi (veau n° AHA) a été éprouvé un mois après par inoculation de 1 cent. cube de sang virulent; il a alors fait la peste.

Notons enfin que la pulpe des mêmes rates N-1 et N-2, conservée à la température de 30°, avait déjà perdu sa virulence lors de la première épreuve, un mois après la récolte.

Essai comparatif du sang virulent. Les sangs mélangés des veaux n° N-1 et N-2, qui ont fourni la pulpe splénique de cette expérience, avaient été défibrinés au moment du sacrifice et répartis en tubes placés dans la même bouteille thermos que la pulpe; on en a injecté successivement 5 cent. cubes au veau n° E-630 après quinze jours de conservation, 5 cent. cubes au veau n° D-947 après un mois, 20 cent. cubes au veau n° US après un mois et demi; le veau n° E-630 a fait la peste, les deux autres sont restés indemnes: réinoculés ultérieurement avec du sang virulent ils ont contracté l'un et l'autre une peste grave.

TROISIÈME EXPÉRIENCE (fragments de thymus). — On saigne, six jours après l'inoculation virulente, un veau de passage (veau n° E); on prélève aseptiquement son thymus, le dissèque rapidement pour éliminer le tissu conjonctif qui l'enveloppe et le fragmente grossièrement; les fragments sont répartis dans des tubes stériles qu'on maintiendra comme précédemment à la température de 0° : des tubes témoins sont placés dans l'obscurité à la température du milieu (30°).

Après deux mois de conservation, on prélève quelques fragments de chaque préparation, les écrase dans des mortiers, émulsionne les pulpes dans 9 parties d'eau physiologique et injecte : au veau n° AHK 10 cent. cubes de l'émulsion de thymus conservé à la température de 0°, et au veau n° AEM 10 cent. cubes de l'émulsion de thymus conservé à la température de 30°; le premier contracte la peste, le deuxième reste indemne mais contractera la maladie lors de l'inoculation d'épreuve.

Après quatre mois de conservation, on prépare une émulsion de thymus conservé à la température de 0° et on en injecte 10 cent. cubes au veau n° ANE : ce veau ne présente aucun trouble et reste réceptif.

QUATRIÈME EXPÉRIENCE (fragments de thymus). — On conserve à 0°, selon la même technique que précédemment, le thymus du veau n° B-3 sacrifié le septième jour de la maladie expérimentale.

Après deux mois et demi de conservation, on prépare une émulsion de pulpe au 1/10 et en injecte 10 cent. cubes au veau n° AIF : ce veau fait la peste.

Après quatre mois et demi, on répète l'expérience et inocule le veau n° AOA; ce veau contracte encore la maladie.

Après cinq mois et demi, on fait un troisième essai en inoculant le veau n° AOT; ce veau reste indemne.

Ainsi on peut conserver le virus pestique pendant plusieurs mois dans certains tissus organiques placés à la température de 0°; dans l'une de nos expériences la pulpe splénique donnait encore la maladie à la dose de 1 gramme sept mois après le prélèvement de l'organe; dans une autre expérience le thymus possédait la même aptitude après quatre mois et demi de conservation.

2° Conservation du virus dans les tissus déshydratés.

a) CONSERVATION A UNE TEMPÉRATURE BASSE. — Nous avons expérimenté avec le tissu splénique qu'on peut très facilement et très rapidement amener à l'état d'une pulpe fine et homogène.

Il s'agit ici de la rate d'un veau, n° H-1, sacrifié pour la préparation du vaccin, le septième jour de la maladie expérimentale.

La matière virulente ayant été finement pulpée par hachage

et tamisage, on la dessèche complètement par un séjour de quatre heures sous la cloche d'une machine à vide (du modèle dit pompe à huile). On recueille alors une substance sèche qu'on réduit en poudre dans un mortier. On répartit dans des tubes stériles bien secs qu'on place à 0° dans une bouteille thermos.

Pour l'emploi, la poudre sera émulsionnée dans une quantité d'eau à peu près équivalente à celle qui a été soustraite au tissu dans le vide de la pompe.

On effectue successivement quatre essais, deux mois, trois mois, quatre mois et cinq mois après la préparation; les veaux employés, n°s AIG, AKL, AOB, AOS recevant chacun à tour de rôle 0 gr. 25 de rate anhydre, ce qui correspond approximativement à 1 gramme de pulpe brute.

Tous ces animaux font une peste caractérisée qui évolue chez tous suivant le même rythme et dans les délais ordinaires; on les sacrifie vers le dixième jour; l'autopsie confirme le tableau clinique.

b) CONSERVATION A LA TEMPÉRATURE DU MILIEU. — Dans l'expérience précédente, lors de la première épreuve (après deux mois) on a inoculé comparativement un veau n° E-874, avec 0 gr. 25 de la même rate anhydre conservée à la température ordinaire (30°); il n'a présenté aucun trouble, mais s'est vacciné, car réinoculé ultérieurement il n'a pas réagi au sang virulent.

Signalons qu'en outre, au cours de recherches ayant un objet différent, nous avons eu d'autres occasions d'injecter des émulsions de pulpe splénique déshydratée conservée à la température du milieu; nous avons pu faire les observations suivantes; la matière sèche s'est montrée virulente pour le veau :

Après vingt-quatre heures, 1 fois à la dose de 0 gr. 75.

Après vingt-quatre heures, 1 fois à la dose de 0 gr. 25.

Après six jours, 1 fois à la dose de 1 gramme. Elle a toujours été avirulente après dix et douze jours de conservation.

Ainsi la substance splénique déshydratée rapidement et complètement, puis conservée à 0°, est restée virulente à la dose de 0 gr. 25 représentant approximativement 1 gramme de pulpe brute pendant plus de cinq mois; la même substance ne reste virulente que pendant quelques jours à la température de 30°.

Unicité ou pluralité du virus pestique.

La pluralité du virus aphteux, dont la démonstration a été faite par Vallée et Carré, a, pour tout ce qui concerne l'épidémiologie et la prophylaxie de cette contagion, une importance qui s'affirme tous les jours. Bien qu'*a priori* la même question ne puisse revêtir un intérêt comparable en ce qui a trait à la peste bovine, il n'était pas inutile de réunir quelques précisions sur ce point.

Nous nous sommes donné pour objet, dans les expériences qui sont rapportées ici, de comparer à notre virus de Nha-trang des virus provenant du Tonkin, du Laos et de Cochinchine (1).

1° EFFETS RESPECTIFS PRODUITS CHEZ LE VEAU PAR L'INOCULATION EXPÉRIMENTALE DES DIVERS VIRUS.

Notre premier soin a été de vérifier l'activité des virus de ces trois origines au moment de la réception, puis, cela fait, et pour en disposer pendant toute la durée des expériences, nous avons employé séparément le virus du Laos et celui de Cochinchine à des passages hebdomadaires de veaux à veaux; soixante passages ont été effectués avec le virus de Laos, cinquante-huit avec celui de Cochinchine; nous n'avons pu observer les sujets inoculés que pendant une semaine, car, ce temps écoulé, leurs organes étaient utilisés à la préparation du vaccin antipestique; la période d'incubation a été en moyenne de :

Trois jours et cinq heures avec le virus de Laos.

Trois jours et cinq heures avec le virus de Cochinchine; à la même époque, elle était de :

Trois jours et sept heures avec le virus de Nha-trang.

L'hyperthermie maximum avant l'abatage a été en moyenne de :

40°73 avec le virus de Laos.

40°67 avec le virus de Cochinchine.

(1) Nous remercions ici MM. Cèbe, Cottin et Vittoz qui ont bien voulu se charger de recueillir et de nous adresser ces virus.

Elle était alors de :

1°65 avec le virus de Nhatrang.

De ces deux points de vue, par conséquent, on peut enregistrer une très légère supériorité d'action du virus laotien sur les deux autres et du virus cochinchinois sur le virus de Nhatrang.

2° EXPÉRIENCES D'IMMUNISATION CROISÉE.

A. — *Essais comparatifs du virus de Nhatrang et du virus du Tonkin.*

a) Inoculation première avec virus de Nhatrang, épreuve ultérieure avec virus du Tonkin.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Le bœuf n° 1082 a été immunisé le 9 juin 1928 par injections simultanées de sérum et de virus de Nhatrang.

Le 27 septembre 1929, on lui injecte 300 cent. cubes de sang virulent provenant directement du Tonkin; il ne manifeste aucune réaction.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Le veau n° BX a été employé au passage du virus de Nhatrang le 16 juillet 1928.

Le 10 octobre 1929, on lui injecte 10 cent. cubes de virus de Hanoï (sang d'un veau de passage). Le 11, on lui injecte encore 50 cent. cubes de sang du même veau, il ne marque aucun trouble. Pour s'assurer qu'il est bien réfractaire à l'infection pestique on lui prend, quatre jours de suite, 50 cent. cubes de sang, les 15, 16, 17, 18 octobre, et on inocule chaque fois le veau neuf n° LX; ce veau reste indemne; éprouvé le 13 novembre avec du sang virulent il fera une peste mortelle.

b) Inoculation première avec virus du Tonkin, épreuve avec virus de Nhatrang.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Le veau n° LP est séro-infecté le 11 novembre 1929 par injections simultanées de virus de Hanoï (sang virulent d'un veau de passage) et de sérum (1); il fait une réaction très légère. Le treizième jour, on éprouve sa résistance au virus de Hanoï par injection de 2 cent. cubes de sang virulent de cette provenance; il ne réagit pas davantage.

Le 20 novembre, on lui injecte 50 cent. cubes de virus de Nhatrang (sang du veau de passage n° 433-B); il ne présente aucun trouble.

(1) Notons que le sérum employé à cette séro-infection et qui s'est montré capable d'atténuer dans la mesure désirée la maladie provoquée par le virus de Hanoï avait été fourni par des bœufs préparés avec du virus de Nhatrang.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Le veau neuf n° D-788 reçoit, le 16 octobre 1929, 1 cent. cube de virus du Tonkin (sang d'un veau de passage); il réagit violemment.

Le 13 novembre, on lui injecte 5 cent. cubes de sang du veau n° 432-B (virus de Nhatrang); il ne manifeste aucun trouble.

B. — *Essais comparatifs du virus de Nhatrang
et du virus de Cochinchine.*

a) Inoculation première avec virus de Nhatrang; épreuve avec virus de Cochinchine.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Le veau n° HQ a été inoculé avec du virus de Nhatrang le 9 juin 1929.

Le 10 mars 1930, on lui injecte 200 cent. cubes de sang virulent provenant directement de Cochinchine: il ne manifeste aucun trouble.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Le bœuf n° 1081 a été immunisé le 9 juin 1928 par injections simultanées de sérum et de virus de Nhatrang.

Le 1^{er} avril 1930, on lui injecte sous la peau 100 cent. cubes de virus de Cochinchine (sang virulent d'un veau de passage); il ne réagit en aucune façon.

b) Inoculation première avec virus de Cochinchine; épreuve avec virus de Nhatrang.

Le veau n° R-A reçoit, le 10 mars 1930, 100 cent. cubes de sang virulent provenant directement de Cochinchine; la peste évolue chez lui sous une forme grave, mais il guérit néanmoins.

Le 8 avril, on lui injecte 5 cent. cubes de virus de Nhatrang; il ne présente aucun trouble.

C. — *Essais comparatifs du virus de Nhatrang
et du virus du Laos.*

a) Inoculation première avec virus de Nhatrang: épreuve avec virus de Laos.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Le veau n° P-A a été inoculé avec du virus de Nhatrang le 19 février 1930; il a fait une peste typique suivie de guérison.

Le 23 mai, on lui injecte 200 cent. cubes de virus provenant directement du Laos; il ne réagit pas.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Le bœuf n° 1076 a été immunisé le 9 juin 1928 par injections simultanées de sérum et de virus de Nhatrang.

Le 31 mai 1930, on lui injecte 40 cent. cubes de virus du Laos (sang d'un veau de passage); il ne présente aucun trouble.

b) Inoculation première avec virus du Laos; épreuve avec virus de Nhatrang.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Le veau n° U-P a été inoculé le 23 mai 1930 avec 100 cent. cubes de virus du Laos (sang de provenance directe): il a fait une maladie grave.

Le 25 juin, on lui injecte 50 cent. cubes de sang virulent de Nhatrang, il ne réagit pas.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Le veau n° U-Q a reçu successivement le 24 mai et le 28 juin 1930 20 cent. cubes et 50 cent. cubes de virus du Laos; il réagit à la première injection mais de façon fruste (abcès au point d'inoculation).

Le 18 juillet, on lui injecte 50 cent. cubes de sang virulent de Nhatrang: il reste indemne.

3° ÉPREUVES AVEC DES VIRUS D'ORIGINES DÉTERMINÉES
DE L'IMMUNITÉ CONFÉRÉE PAR UN ANTIGÈNE D'ORIGINE DIFFÉRENTE.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Les veaux n°s E-691, E-703, E-716, E-725, E-727 ont été vaccinés le 30 mai 1930; on leur a injecté pour cela à chacun 15 cent. cubes d'un vaccin composé, au toluène, et préparé avec les organes d'un veau préalablement inoculé avec du virus de Nhatrang.

On les éprouve le 18 juin dans les conditions suivantes:

E-725 et E-716 reçoivent chacun 2 cent. cubes de virus de Laos (sang de passage).

E-727 et E-691 chacun 2 cent. cubes de virus de Cochinchine (sang [de passage]).

E-203, 2 cent. cubes de virus de Nhatrang. Tous restent indemnes.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Le vaccin utilisé ici est un vaccin au toluène préparé avec les organes d'un veau préalablement inoculé avec du virus de Cochinchine.

Ce vaccin a été titré méthodiquement, *in vivo*; il immunisait solidement le veau de 100-120 kilos à la dose de 2 cent. cubes, mais pas à moins.

On vaccine deux veaux n°s AJD, AJE, chacun d'eux recevant 2 cent. cubes du vaccin; un mois après, on éprouve leur résistance par injection de virus du Laos (sang d'un veau de passage); ils résistent l'un et l'autre sans manifester aucune réaction.

CONCLUSIONS.

Les premières observations rapportées laissent supposer qu'il existe, entre les divers virus que nous avons étudiés, de légères différences d'action sur l'organisme du veau; il n'est pas surprenant en effet que, comme la plupart des microbes pathogènes, l'agent de la peste bovine soit susceptible de variations d'activité ou d'agressivité; mais par contre, de ce que nous avons exposé

ensuite, on peut conclure que les souches virulentes originaires du Laos, du Tonkin et de la Cochinchine ne différaient pas, quant à leurs qualités immunologiques, du virus de Nhatrang.

Au surplus, on remarquera que chacune des souches étudiées avait bénéficié antérieurement, dans son habitat, de conditions très favorables à l'acquisition éventuelle d'une individualité propre; le virus de Vientiane avait subi deux cent cinquante passages sur porcs laotiens avant de nous être adressé; le virus de Hanoï, prélevé dans un foyer de peste bovine du delta tonkinois en 1928, avait subi cinquante passages sur des veaux achetés dans la région et, par conséquent, provenant d'élevages du nord de l'Indochine ou de la Chine; le virus de Cochinchine, recueilli lui aussi dans un foyer, sur un buffle, pouvait être considéré comme provenant d'une souche qui s'entretient depuis plusieurs années dans les troupeaux du Sud Indo-Chinois; enfin notre virus n'a eu pour hôtes depuis plus de dix ans que des animaux des régions voisines de Nhatrang (Khanh-Hoa, Binh-Thuân et Phu-Yên).

Du fait que ces quatre souches virulentes sont restées des antigènes identiques les uns aux autres, on peut induire qu'elles étaient, de ce point de vue, incaptes à subir des transformations durables; et cette constatation autorise à penser que, d'une manière générale, il n'existe qu'un seul virus pestique dans les divers pays infectés de peste bovine.

La teneur en virus de quelques tissus des animaux atteints de peste bovine.

On a constaté il y a longtemps que, dans l'organisme des malades, tous les tissus, toutes les humeurs, toutes les sécrétions et excrétions sont virulents ou peuvent l'être; mais, à vrai dire, on ne possède aucune précision sur la richesse en germes des divers organes ou tissus; cependant, il faut faire exception pour le sang; Schein a établi en 1915 que, chez la chèvre annamite atteinte de peste, au moment du maximum thermique, le sang contient environ 25.000 unités virulentes ou groupes d'unités virulentes par centimètre cube.

Dans le dessein d'étendre nos connaissances sur ce point, et

spécialement en vue d'applications à l'étude du vaccin anti-pestique, nous avons cherché à évaluer le degré de virulence de quelques organes des animaux atteints de peste.

Les tissus étudiés ont été prélevés sur des veaux préalablement inoculés avec du virus pestique et sacrifiés au moment du maximum thermique, du sixième au huitième jour.

Les fragments employés à la préparation des émulsions étaient broyés au mortier en présence de sable stérile et d'une petite quantité d'eau physiologique ; on étendait d'eau ensuite pour obtenir les dilutions recherchées.

La virulence des dilutions préparées a été éprouvée par inoculation à la chèvre le plus souvent, parfois au veau. Les sujets d'épreuve, chèvres ou veaux, qui n'avaient pas présenté de réaction caractéristique, ont été réinoculés ultérieurement avec du sang virulent.

Les chiffres que nous avons obtenus ne doivent être considérés que comme approchant la réalité, en raison de l'imprécision d'expériences comme celles-là, mais on en peut tirer néanmoins les conclusions suivantes :

1° *Si, chez les veaux expérimentalement infectés de peste bovine, tout l'organisme est virulent, la teneur moyenne en virus des divers milieux ne paraît pas être considérablement élevée.*

2° *Parmi les tissus que nous avons étudiés, c'est la muqueuse de la caillette qui s'est montré le plus riche en unités virulentes, jusqu'à 300.000 par gramme ; les autres muqueuses, trachéale, buccale, vulvo-vaginale et la peau possèdent comme le sang, la rate, le foie, le poumon, les ganglions lymphatiques, et le thymus, une teneur nettement inférieure, ne dépassant généralement pas 50.000 unités par gramme. Ces résultats sont à rapprocher du fait que, chez nos veaux inoculés de peste bovine, les lésions de la caillette sont d'ordinaire parmi les plus accusées ; ils confirment l'électivité de cette muqueuse pour le virus pestique.*

Ajoutons enfin que, comparativement, le sang a été trouvé virulent 2 fois sur 3 au 1/25 000, 0 fois sur 2 et 0 fois sur 3 au 1/30.000 et au 1/50.000, 1 fois sur 4 au 1/75.000, 0 fois sur 4 au 1/100.000.

QUELQUES CONSIDÉRATIONS SUR L'INFECTION PESTIQUE

La question des porteurs chroniques de virus pestique.

Nul n'ignore aujourd'hui l'importance des porteurs de germes en matière d'épidémiologie; or, si l'existence de ces agents insoupçonnés de la contagion est bien établie pour un certain nombre de maladies de l'homme et des animaux, elle est discutée en ce qui concerne la peste bovine.

Nous nous sommes proposé d'étudier cette question en Indochine. Mais d'abord précisons le problème.

Dans l'espèce qui nous occupe, nous pensons qu'on pourrait considérer comme un porteur de germes tout sujet qui, ayant été aux prises avec l'infection pestique, et alors qu'aurait pris fin chez lui la période d'évolution des signes de la maladie, recèlerait du virus en quelque point de son organisme; nous admettons *a priori*, ce qui met les choses au pire et ne saurait par suite affaiblir les conclusions, qu'un tel sujet serait susceptible d'émettre du virus et, par conséquent, de propager la maladie.

Dans le cas le plus simple, des malades chez qui la peste ne laisse aucune séquelle objectivement appréciable, l'évolution clinique s'achève du quinzième au vingtième jour; mais il est assez difficile de fixer rigoureusement, du point de vue bactériologique, le moment où prend fin la maladie et où la guérison est effective; aussi n'est-ce que chez les animaux ayant largement franchi ce stade qu'il conviendrait de reconnaître éventuellement des porteurs de germes.

Mais par contre, il est fréquent, en Indochine notamment, qu'à la suite de l'évolution de la peste, les animaux présentent pendant plusieurs semaines, et même plusieurs mois, des signes d'entérite chronique, généralement avec diarrhée; on pourrait soutenir qu'à ce moment ils sont encore aux prises avec le virus pestique et les considérer comme des simples « contagieux »; nous ne le pensons pas et il nous semblerait légitime d'en faire des « porteurs de germes » s'ils continuaient à abriter du virus en quelque point de leur organisme; cette conception ne peut

en tout cas que renforcer les conclusions à tirer de l'étude que nous présentons.

A. — ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.

I. — *Recherche directe du virus dans les humeurs et les tissus d'animaux guéris.*

Nous avons cherché à six reprises, mais sans succès, à mettre le virus pestique en évidence dans l'organisme de sujets précédemment infectés par inoculation expérimentale. Nous nous bornerons à rapporter ici les trois expériences les plus intéressantes.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — 1° Le veau n° 709 a été séro infecté le 18 septembre 1928, mais, un abcès s'étant formé au point d'injection du sérum, il a fait une peste bovine assez violente au cours de laquelle s'est installée une diarrhée tenace qui persiste encore après deux mois et demi; à ce moment, l'amaigrissement du sujet se chiffre par 40 kilogrammes (poids initial : 120 kilogrammes).

On recueille trois jours de suite ses excréments et chaque fois on en fait ingérer 1 litre au veau neuf n° EM.

On ne relève aucun trouble chez cet animal; éprouvé dans la suite, il fera une peste mortelle avec les lésions classiques.

2° Le 10 décembre, après avoir effectué les prélèvements mentionnés plus haut, on sacrifie le veau 709; à l'autopsie, on observe sur la muqueuse buccale et sur celle de la caillette des cicatrices étoilées; l'aspect de la valvule iléo-cæcale et du cæcum indique qu'en ces points la muqueuse reste enflammée.

On prélève au niveau de ces diverses lésions des fragments de muqueuse; on les hache et les administre par ingestion au veau neuf n° EN.

Aucun trouble ne survient chez cet animal; éprouvé ultérieurement il fera une peste bovine mortelle.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — La vache n° 351-B, inoculée avec du virus pestique le 17 avril 1928, fait une maladie grave puis avorte trente-quatre jours après l'inoculation virulente.

1° On lui prend 50 cent. cubes de sang qu'on injecte au veau n° AL.

2° On prélève d'autre part un peu du liquide muqueux qui s'écoule du vagin avec une glaire lochiale; on émulsionne en eau physiologique et on injecte au veau n° AL.

Le veau AL ne manifeste aucun trouble et reste sensible au virus pestique; le veau AL fait au contraire une peste mortelle.

3° La même vache s'étant beaucoup amaigrie et restant en très médiocre état, le 6 juin on lui prend 200 cent. cubes de sang qu'on injecte au veau AU; ce veau reste indemne; éprouvé trois semaines après par inoculation de sang virulent il présente des oscillations thermiques anormales mais pas de

signes nets de peste bovine; on peut considérer qu'il était encore couvert à ce moment par l'immunité passive résultant de l'injection préalable d'une quantité importante de sang de la vache guérie.

4° Le 16 juin, on sacrifie la même vache 351-B; les plaques de Peyer et les cotylédons portent les traces d'une inflammation assez vive, chronique ou subaiguë; l'utérus contient un liquide de la couleur du marc de café. On fait les prélèvements nécessaires et on inocule à deux sujets neufs; le veau n° AV reçoit l'extrait des plaques de Peyer, le veau n° AX, l'extrait des cotylédons et le liquide utérin; ni l'un ni l'autre de ces veaux ne réagit; éprouvés un mois et six semaines après, respectivement, ils feront tous deux une peste mortelle.

TROISIÈME EXPÉRIENCE. — Le veau n° V qui, avant toute intervention, souffrait de trachéo-bronchite chronique, est exposé à la contamination par cohabitation étroite avec des malades; la peste évolue chez lui à partir du 25 mai 1928; il s'amaigrit progressivement et le 5 juillet on le sacrifie *in extremis* (quarante jours après le début de la maladie).

A l'autopsie, on relève des lésions d'inflammation chronique du cæcum et du gros intestin.

On recueille des matières dans l'intestin, on prélève des fragments de muqueuse qu'on réduit en pulpe; matière et pulpe sont administrées *per os* au veau n° BK.

On recueille également des mucosités trachéales et bronchiques, on les dilue et les inocule par voie intratrachéale au veau n° BL.

Enfin on injecte au veau n° BI 200 cent. cubes de sang de l'animal sacrifié.

Rien d'anormal ne se produit chez les veaux BE, BK et BL; éprouvés respectivement le 11 septembre, le 25 septembre et le 7 octobre, ils feront tous les trois une peste mortelle.

II. — *Essais de mise en évidence de l'infectiosité des animaux guéris.*

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — On fait cohabiter pendant un mois 1 veau neuf n° D-794 et 3 veaux n° KG, 699 et JC qui ont été inoculés avec du virus pestique un mois avant et qui, très amaigris par la maladie, en ont gardé une entérite caractérisée avec diarrhée.

Ces animaux sont logés dans une stalle exigüe; l'herbe, qui constitue toute leur ration, leur est donnée à même le sol; ils la piétinent et la souillent de leurs déjections; enfin, ils n'ont pour boire qu'une augette commune; on pouvait penser que, dans ces conditions, le sujet sain échapperait bien difficilement à la contagion si parmi les malades se trouvait un porteur de germes susceptible de transmettre la peste; or, cet animal est resté indemne; éprouvé ultérieurement par inoculation de sang virulent il a fait une peste classique.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — En septembre 1929, on choisit 26 jeunes bovins de quinze mois à quatre ans qui ont fait antérieurement la peste, et dont l'état général est resté très médiocre (maigreur accusée, poil terne et piqué, alternatives de constipation et de diarrhée, etc.); ces animaux ont eu la peste respectivement aux époques suivantes :

1	2 mois avant l'expérience.	
1	4 —	—
3	5 —	—
4	6 —	—
3	8 —	—
2	9 —	—
3	12 —	—
1	13 —	—
1	19 —	—
1	21 —	—
1	22 —	—
2	26 —	—
2	29 —	—
1	36 —	—

On joint à ces 26 guéris 1 veau neuf du laboratoire et on mêle les 27 sujets aux animaux du troupeau d'un fermier indigène; ce troupeau comprend 3 bœufs de plus de six ans, 3 bœufs et 3 vaches de moins de cinq ans, 2 jeunes veaux; les 3 bœufs les plus âgés peuvent être considérés comme résistants à l'infection pestique, car la maladie a frappé le bétail de la région en 1922-1923; les 8 autres animaux au contraire, nés sur place et postérieurement à cette époque, peuvent être considérés comme réceptifs; tous les animaux vivront ensemble pendant six mois, passant la journée en vaine pâture sur les friches du voisinage et groupés pour la nuit dans un enclos rudimentaire, à même le sol et à ciel ouvert.

Au cours de l'expérience, 8 des sujets précédemment frappés de peste sont morts, l'un d'indigestion, les autres d'épuisement progressif; mais on n'a rien observé de particulier chez les animaux du fermier, ni chez le veau neuf du laboratoire.

L'expérience terminée, c'est-à-dire après six mois de cohabitation, on ramène au laboratoire les 18 sujets guéris, le veau neuf et l'un des animaux du fermier, un taurillon de quatre ans.

Ces deux derniers, faisant office de témoins, sont éprouvés par inoculation de sang virulent; ils contractent tous les deux une peste grave; on sacrifie le taurillon le sixième jour, le veau meurt le onzième jour; les observations à l'autopsie viennent confirmer les symptômes cliniques de peste.

B. — FAITS D'OBSERVATION.

Premièrement. — L'Institut Pasteur possède à Suôi-Giao, à une vingtaine de kilomètres de Nhatrang, une station d'élevage annexée au laboratoire; nous y entretenons un troupeau de 500 vaches qui fournissent au service de la peste bovine les veaux nécessaires à la préparation du sérum et du vaccin antipestiques ainsi qu'aux recherches sur les maladies du bétail indochinois; toutes ces vaches ont été séro-infectées, les unes dans la station, les autres à Nhatrang; ces dernières ont pris place respectivement dans le troupeau six ou huit semaines après la séro-infection: leurs veaux sont en majeure partie employés à Nhatrang comme nous l'avons dit, mais les plus beaux sont conservés comme élèves, les femelles pour la reconstitution du troupeau de vaches, les mâles pour servir ultérieurement de bœufs producteurs de sérum ou de bœufs de travail; ces sujets sélectionnés sont immu-

nisés à quinze mois contre la peste bovine, à Nhattrang, par séro-infection, et renvoyés six semaines après dans la station d'élevage. Enfin, c'est à Suôi-Giao que nous mettons à l'engrais, pour les livrer ensuite au commerce, les animaux qui ont été employés à Nhattrang au passage du virus pestique ou aux inoculations expérimentales de peste bovine et dont l'organisme n'a pas été irrémédiablement lésé par l'infection pestique.

Si nous ajoutons maintenant que les veaux qui naissent des 500 vaches de notre élevage sont aptes à contracter la peste à partir de leur troisième mois, qu'ils sont constamment en contact avec les vaches, qu'ils voisinent avec les autres animaux de la station et se nourrissent sur les mêmes pâturages que ceux-ci, on comprendra que, n'ayant jamais observé un cas de contamination pestique parmi eux de 1924 à 1931, nous considérons l'existence des porteurs de germes comme une éventualité plutôt exceptionnelle dans la peste bovine du bétail d'Indo-Chine.

Deuxièmement. — Il y a des provinces entières en Indo-Chine, et même de vastes régions comprenant plusieurs provinces, où la peste bovine sévit de façon permanente, ne touchant généralement qu'une partie du territoire, mais y subsistant toujours en quelque point; c'est là que l'on pourrait être tenté d'incriminer les porteurs de germes; leur intervention expliquerait, en effet, la formation souvent incomprise de foyers apparemment sans relation les uns avec les autres et en des régions visitées peu de temps avant par le contagé. Mais on peut donner à cela d'autres explications; nous mentionnerons parmi elles l'introduction dans les troupeaux de sujets réceptifs provenant de lointaines régions d'élevage, sujets dont le rôle se borne parfois à alimenter les foyers existants, mais qui peuvent au surplus servir de véhicule au virus pestique; nous ferons observer aussi que l'application des mesures sanitaires et prophylactiques, si elle permet en de nombreux cas de protéger les territoires encore indemnes en étouffant les foyers existants, ne réalise pas toujours l'éradication totale de la contagion, laissant ainsi subsister le danger, et particulièrement pour les effectifs qui, grâce à elle, avaient échappé à cette contagion.

Il existe aussi en Indo-Chine, par opposition aux zones où la peste prend les aspects d'une contagion endémique, des régions où elle disparaît complètement et pour ne pas reparaitre de longtemps, après avoir brutalement frappé leur bétail. On n'a pas observé un seul cas de peste bovine dans les provinces du Sud-Annam depuis environ huit ans, pas un cas non plus dans le Phu-Yên, vaste réservoir de bétail, depuis près de vingt ans; enfin, le chef de Service vétérinaire de l'Annam nous signalait récemment que, « de mémoire d'homme, on n'avait pas vu de peste bovine dans le Centre-Annam ». Or, nous l'avons dit, les veaux annamites nés de parents précédemment touchés par la peste deviennent réceptifs entre trois et six mois; on s'expliquerait mal que, dans les immenses troupeaux que représente le bétail des régions dont nous parlons, la peste puisse rester absolument inconnue pendant si longtemps, s'il s'y trouvait des porteurs chroniques de virus.

CONCLUSIONS.

Ainsi, mis à part le cas de la vache qui venait d'avorter, il ne nous a pas été possible de retrouver expérimentalement le virus pestique chez des sujets guéris qui, cependant, pouvaient être

tenus pour suspects de ce point de vue ; et nous avons montré, d'autre part, que certaines considérations épidémiologiques s'alliaient mal à l'hypothèse de l'existence de porteurs chroniques de virus pestique.

Sans doute les arguments présentés ici ne sont que des arguments négatifs ; sans doute pourrait-on objecter que la recherche du virus a été effectuée chez des sujets guéris de peste bovine inoculée et non de la maladie contractée ; nous n'irons donc pas jusqu'à considérer comme absolument impossible que certains malades restent porteurs de germes après la guérison, mais, de ce que nous avons exposé, il ressort, croyons-nous, que de tels sujets, s'ils existent, sont très rares. Il semble donc qu'en tout état de cause leur rôle soit très réduit en Indo-Chine, dans la perpétuation du contagé et la formation des foyers de peste bovine ; il ne saurait être comparé par exemple à celui des porteurs du bacille de Löffler ou du bacille d'Eberth et son importance n'est certainement pas telle qu'il puisse aggraver sensiblement les conditions de la lutte contre les épizooties de peste

L'infection pestique inapparente.

A la question des porteurs chroniques de virus pestique se rattache celle des sujets chez lesquels l'infection se développe silencieusement, dans les limites de temps où se fait habituellement l'évolution de la maladie ordinaire.

Nous avons observé maints exemples de cette modalité de l'infection et plusieurs fois nous avons pu contrôler la présence du virus dans l'organisme ; en voici quelques cas précis :

A. — L'APTITUDE DU SUJET A DISSIMULER SON INFECTION EST NATURELLE.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Un bouc de race indienne est inoculé le 31 juillet 1928 avec 1 cent. cube de sang virulent du veau n° 365-A ; il ne manifeste aucun trouble ; sa température reste normale, il mange et même engraisse par suite sans doute de la stabulation qui lui est imposée, et, cependant, l'infection pestique se développe dans son organisme.

En effet, le 4 et le 5 août d'abord (quatre et cinq jours après l'inoculation), on prélève dans la jugulaire 10 cent. cubes de sang qu'on injecte au veau n° CV ; ce veau contracte la peste et meurt. Puis le 7 et le 8 août (sept et

huit jours après l'inoculation), on inocule dans les mêmes conditions le veau n° C-634; ce veau fait une peste classique; on le sacrifie le septième jour, à des fins expérimentales.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Une brebis du Yunnan reçoit, le 28 octobre 1928, 1 cent. cube de sang virulent du veau n° 378-B; elle ne présente par la suite aucun signe morbide et, néanmoins, son sang contient du virus pestique.

En effet, chaque jour, du cinquième au onzième jour de la maladie, on prélève 10 cent. cubes de sang qu'on injecte au veau n° EA; ce veau contracte la peste et meurt.

B. — L'APTITUDE DU SUJET A DISSIMULER SON INFECTION RÉSULTE DE QUELQUE TRAITEMENT.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Le 21 octobre 1928, le veau n° 761 reçoit simultanément, en deux points, 1 cent. cube de sang virulent et 90 cent. cubes de sérum antipestique; aucun signe clinique ne se manifeste; pas de fièvre, pas de changement dans l'habitus.

Le sixième et le septième jour, on lui prend 50 cent. cubes de sang qu'on injecte au veau n° C-766; ce veau contracte une peste très grave, dont il guérit pourtant.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Le veau n° 634-A, vacciné par injection de pulpe de poumon en octobre 1927, est éprouvé en janvier 1928 par inoculation de 2 cent. cubes de sang virulent; il ne présente pas de réaction; la vaccination a été efficace.

Mais sept jours après l'inoculation virulente, on lui prend 20 cent. cubes de sang qu'on injecte au veau n° A-869; ce veau fait une peste bovine typique et meurt.

CONCLUSIONS.

La peste bovine peut évoluer sous une forme absolument inapparente chez certains sujets considérés comme réfractaires à son atteinte ou artificiellement immunisés contre elle.

L'existence de l'infection inapparente se traduit par la virulence du sang dans les jours qui suivent l'inoculation de virus pestique; il paraît superflu d'ajouter que cette infection silencieuse est en quelque manière une infection avortée; on comprend que, dans ces conditions, le virus ne se développe ni abondamment ni longtemps dans l'organisme et que l'on ne réussisse pas régulièrement à l'y mettre en évidence.

Cet état particulier de réceptivité représente le premier degré de la sensibilité à la peste bovine; de l'infection inapparente à l'infection mortelle, il y a place pour toutes les formes de la réaction et toutes ces formes sont connues.

Du point de vue pratique, car on ne saurait douter de la possibilité de l'infection inapparente après contamination naturelle, cette constatation appelle une remarque importante. On peut penser, et l'expérience semble le confirmer, que d'ordinaire les animaux en état d'infection inapparente ne sont pas contagieux; mais ce que l'on sait de la pathogénie de la peste bovine conduit à admettre qu'ils sont susceptibles de le devenir: la résistance particulière, acquise ou spontanée, qu'ils opposent à la maladie n'apparaît pas comme un état parfaitement stable, elle peut être surmontée; on conçoit ainsi que, chez de tels sujets, à l'infection inapparente puisse se substituer une forme très légère de la maladie, qui, sans éveiller de soupçons, fasse d'eux des malades, et des malades contagieux; ils pourraient donc à l'occasion jouer un rôle important dans la propagation de la maladie, sur place ou à distance.

La réceptivité du lapin pour le virus de la peste bovine.

Ayant ainsi constaté que certains animaux des espèces réceptives contractaient la peste bovine sous une forme inapparente, nous nous sommes proposé de rechercher si cette modalité de l'infection ne se réaliserait pas, après l'inoculation expérimentale, chez le lapin considéré jusqu'à présent comme réfractaire au virus pestique.

Pour donner plus de netteté aux réactions éventuelles, nous avons sensibilisé les lapins préalablement à l'inoculation virulente, par une injection de sang virulent défibriné, puis stérilisé par le formol ou, plus souvent, par une injection de pulpes organiques virulentes stérilisées et reconnues sans activité préventive.

Nous avons essayé à huit reprises de transmettre l'infection pestique du veau au lapin d'Indo-Chine par injection sous-cutanée de sang virulent; six fois nous avons pu mettre le virus en évidence dans l'organisme du lapin au premier passage; par contre, il n'a pas été possible de le retrouver dans l'organisme des lapins du deuxième et du troisième passage. Enfin, dans les cas positifs, c'est cinq ou six jours après l'inoculation virulente que le virus a pu être décelé.

Voici, d'ailleurs, les plus significatives des expériences effectuées :

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Le 13 février 1930, on sensibilise 6 lapins mâles de huit mois par injection à chacun de 1 cent. cube de sang virulent débibriné, puis formolé à 2 p. 1.000.

Le 27, on leur injecte à chacun 1/2 cent. cube de sang virulent du veau n° V-2; chaque jour ensuite, on saigne à blanc l'un des lapins; le sang des deux premiers (premier et deuxième jour après l'inoculation virulente) est injecté au veau n° SQ; le sang des deux suivants (troisième et quatrième jour) au veau n° QT; le sang des deux derniers (cinquième et sixième jour) au veau n° QU.

Les deux premiers veaux restent indemnes, le veau QU fait la peste et meurt dix jours après la deuxième inoculation.

Ainsi, on a décelé la présence du virus pestique dans le sang des lapins inoculés cinq et six jours avant la saignée, mais pas dans le sang des lapins inoculés un, deux, trois et quatre jours avant; il y a donc, chez le lapin, une période d'incubation, et il s'agit bien dans son organisme d'une infection.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Le 1^{er} avril 1920, on sensibilise 9 lapins, n°s 1 à 9, par injection sous-cutanée de pulpes vaccinales inactives. Le 7 mai, on injecte à chacun d'eux 1 cent. cube de sang virulent fourni par les veaux n°s 405-B et 405-C. La recherche du virus dans l'organisme des lapins est effectuée de la manière suivante :

Première partie. — Le 13 mai, donc six jours après l'inoculation virulente, on saigne à blanc les lapins 2, 5, 8, puis on prélève le foie, la rate, l'estomac, et des fragments de l'intestin à différents niveaux; on hache ces tissus et les broie; on en administre une partie (50 grammes) au veau n° HV par ingestion; on émulsionne le reste dans 10 parties d'eau physiologique, on filtre sur bougie Chamberland F sous 1 kilogramme et on inocule le filtrat au même veau par voie sous-cutanée.

Dans les jours qui suivent, ce veau présente des irrégularités thermiques d'amplitude réduite; le seizième jour, il commence à réagir nettement; les signes cliniques ordinaires se manifestent et l'animal meurt le 6 juin; les lésions relevées à l'autopsie sont bien des lésions de peste bovine (ulcérations palatines et de la caillette).

Deuxième partie. — Les 13, 14 et 15 mai, soit six, sept et huit jours après l'inoculation virulente, on prend 1 cent. cube de sang à chacun des lapins 1, 4, 7 pour inoculer immédiatement le veau n° HE. Ce veau commence à réagir après une semaine; on note une hyperthermie de 3°, des phénomènes congestifs, des phlyctènes buccales; l'animal mourra sept semaines après l'inoculation.

Ainsi, la présence du virus pestique a été mise en évidence à la fois dans les tissus et dans le sang de lapins inoculés une semaine plus tôt.

L'autopsie de ces lapins n'a donné lieu à aucune constatation intéressante; au surplus, les 6 autres lapins n°s 1, 3, 4, 6, 7, 9 inoculés en même temps qu'eux et qu'on a observés pendant un mois n'ont présenté aucun signe pathologique, pas de modification thermique à retenir, pas de changement dans l'habitus.

TROISIÈME EXPÉRIENCE. — Le 28 octobre 1929, on sensibilise 4 lapins n°s 39, 40, 41, 42 par inoculation de pulpe vaccinale d'activité très médiocre.

Premier passage. — Le 20 novembre, on injecte à chacun des deux lapins 30 et 40, 1/2 cent. cube de sang virulent des veaux n^{os} ML et 433-E.

Les 25 et 26, on leur prend à chacun 2 cent. cubes de sang pour inoculer le veau n^o D-877 et les deux autres lapins n^{os} 41 et 42.

Le 27, on saigne le lapin n^o 39 à blanc, injecte son sang (20 cent. cubes) aux mêmes sujets; on prépare, selon la technique précédemment indiquée, une pulpe de quelques-uns de ses tissus et l'administre par ingestion au veau n^o D-877.

Ce veau fait la peste bovine après une incubation de trois jours: le 4 décembre, on lui prend 10 cent. cubes de sang et on inocule le veau n^o 436-II; celui-ci fait la peste, à son tour, et en meurt; le veau n^o D-877 lui-même est sacrifié six jours après l'apparition des premiers signes de peste, et les lésions relevées à l'autopsie confirment encore le diagnostic,

Deuxième passage. — Le 1^{er} et le 2 décembre, on prend 2 cent. cubes de sang à chacun des lapins n^{os} 41 et 42 inoculés les 25 et 26 novembre, et on injecte au veau n^o MS.

Le 3, on saigne à blanc le lapin n^o 42, injecte son sang à MS, puis prépare une pulpe de ses tissus, et l'administre au même veau. Ce veau ne manifeste aucun trouble; réinoculé trois semaines après, il fera une peste ordinaire.

En résumé, le virus pestique a pu être retrouvé dans l'organisme des lapins du premier passage, mais pas chez les lapins du second passage. Notons que l'observation de ces lapins, qui, pour 40 et 41 a été poursuivie pendant deux mois, n'a révélé aucun signe morbide.

CONCLUSIONS.

Ainsi, le lapin d'Indo-Chine n'est pas indifférent au virus de la peste bovine; on doit le considérer comme étant à cet égard à la limite de la réceptivité, car l'infection pestique évolue chez lui sous une forme inapparente, sans déterminer de trouble appréciable; cette infection paraît être d'ailleurs difficilement transmissible en série, par les procédés expérimentaux usuels, aux sujets de la même espèce.

Cette constatation de l'infection inapparente du lapin et les observations du même ordre que nous exposons dans le chapitre précédent conduisent à penser que, d'une manière très générale, la réceptivité des organismes au virus pestique est affaire d'espèce et non de race et que, par exemple, si le porc ne contracte pas la peste bovine dans tous les pays, il n'en est pas moins partout sensible au virus pestique, à quelque race qu'il appartienne: la recherche systématique du virus dans l'organisme de porcins appartenant à des groupes ethniques considérés comme réfractaires permettrait sans doute de les classer parmi les sujets chez lesquels l'infection évolue, si discrète soit-elle, et reste inapparente.

(Institut Pasteur de Nhatrang, Indo-Chine.)

RECHERCHES SUR LA STRUCTURE DE LA GÉLATINE

par JEAN-JACQUES TRILLAT, docteur ès sciences.

On sait depuis longtemps que la gélatine, examinée au microscope polarisant à l'état étiré, est biréfringente, ce qui indique que sous cet état elle possède une anisotropie de structure. Plus récemment, des recherches basées sur la diffraction des rayons X ont apporté à cette question un certain nombre d'éclaircissements nouveaux; nous avons pensé qu'il était peut-être intéressant pour les biologistes de résumer ces travaux, ainsi que les recherches auxquelles nous avons été conduit.

Nous n'indiquerons ici que les résultats essentiels, sans insister sur le détail des interprétations des spectres, que l'on trouvera dans un autre recueil (J.-J. Trillat. *Journal de Chimie-Physique*, 1932).

..

Lorsqu'on place devant un fin collimateur, délimitant un pinceau de rayons X monochromatiques, une substance à l'état microcristallisé, on sait que l'on obtient sur une plaque photographique placée derrière des séries d'anneaux concentriques d'où il est possible de déduire la structure cristalline de cette substance (1).

Si le corps étudié n'est pas cristallisé, s'il s'agit par exemple d'un liquide ou de certains colloïdes organiques, on obtient sur la plaque un ou plusieurs halos à contours plus ou moins bien définis, d'où l'on peut également déduire un certain nombre de renseignements sur la structure de l'état dit « amorphe » (2). Enfin, il arrive que certaines substances pré-

(1) Voir M. DE BROGLIE. Les rayons X. Confér.-rapport. Les Presses universitaires, éditeur; DAUVILLIER. La technique des rayons X. Les Presses universitaires, éditeur; J.-J. TRILLAT. Les applications des rayons X. Les Presses universitaires, 1930.

(2) J.-J. TRILLAT. *Journ. de Chimie-Physique*.

sentent, suivant les circonstances, à la fois les deux états : on trouve alors sur le diagramme des anneaux fins (caractérisant l'état cristallin) et des halos (caractérisant l'état amorphe) : ce qui signifie que les deux phases coexistent dans le corps étudié, et c'est précisément ce qui a lieu pour la gélatine dans certains cas.

Pour terminer ce rapide aperçu de ce que donne la méthode de diffraction des rayons X, nous rappellerons enfin que, si la substance étudiée présente une orientation privilégiée de ses cristaux ou de ses molécules, le diagramme présente une apparence particulière que l'on désigne sous le nom de « diagramme de fibres ». Au lieu d'anneaux ou de halos complets, on n'a plus que des fractions de ceux-ci; la position de ces renforcements et leur intensité permet de tirer un grand nombre de renseignements très importants sur la structure intime de la substance.

Ceci a été appliqué un très grand nombre de fois ces dernières années, notamment dans l'étude de la cellulose et du caoutchouc étiré; nous allons en donner ici une autre application au cas de la gélatine.

I. — Étude de la gélatine non étirée et étirée.

Un certain nombre d'auteurs se sont attaqué au problème de la structure de la gélatine par cette méthode (1). Parmi ceux-ci on peut citer les importants travaux de Kalz, Gerngross, Clark et Lanyon, Herzog, Meyer, Hermann (2).

Dans le présent travail, nous avons cherché d'une part à étudier l'influence du séchage sur l'orientation de la gélatine, ainsi que l'influence de l'étirement, puis le processus du gonflement par l'eau; les résultats expérimentaux permettent de déduire un certain nombre de renseignements sur la structure même de la gélatine (3).

(1) Pour plus de détails, le lecteur se reportera aux ouvrages cités plus haut.

(2) KATZ et GERNGROSS. *Naturwiss.*, **44**, 1925, p. 901; *Köll. Zeit.*, **39**, 11, 1926, p. 181; CLARK et LANYON. *Applied X Rays*, 1927, p. 194; MEYER et MARK. *Biochem. Beihfte*, **214**, 1929, p. 253; HERMANN. *Zeit. f. Phys. Chemie*, **10**, 1930, p. 137; HERZOG. *Helv. Chim. Acta*, **11**, 1928, p. 529.

(3) J.-J. TRILLAT. *C. R. Acad. Sc.*, 27 janvier 1930.

Nous avons d'abord étudié une feuille de gélatine de $P_n = 6.2$, contenant 0,4 p. 100 de cendres, en utilisant la méthode expérimentale décrite plus haut (rayons K du cuivre). L'examen a été effectué suivant deux ou trois directions rectangulaires, d'après une technique que nous avons déjà appliquée antérieurement à propos des films de nitro- ou acétocellulose (*Journ de Physique*, oct. 1930 et févr. 1931).

Cette gélatine a été étudiée d'abord au repos, après séchage sur un filet, et ensuite à l'état allongé (200 p. 100).

a) ÉTUDE DE LA GÉLATINE NON ÉTIRÉE. — Nous n'insisterons pas ici sur le détail des interprétations et des mesures pour lesquelles nous renvoyons le lecteur au *Journal de Chimie Physique* (*loc. cit.*). Nous nous contenterons de donner le résultat des mesures et leur interprétation.

Suivant que l'on examine la gélatine séchée sur un filet perpendiculairement à la surface de séchage ou parallèlement, on obtient deux diagrammes différents. Dans le premier cas (fig. 1, pl. I) on a un halo entouré de deux anneaux fins; dans le deuxième cas, il apparaît des renforcements tout à fait nets sur ces anneaux ou sur ce halo (fig. 2, pl. I).

Les anneaux fins sont attribuables à une diffraction cristalline: leur largeur est cependant un peu trop grande pour être due à des cristaux parfaitement formés, et on doit admettre que ces cristallites sont ou bien très petits, ou bien présentent des déformations. Nous rappellerons qu'il se produit la même chose dans le cas des acétyl et nitrocelluloses, comme nous l'avons montré antérieurement (voir J.-J. Trillat. *Journ. de Phys.*, octobre 1930 et février 1931).

Le grand halo, à contour mal défini et à bords peu nets, présente au contraire tous les caractères des halos obtenus par la diffraction des rayons X dans les liquides ou les corps amorphes. Là aussi, on retrouve le même phénomène que pour les acétyl et nitrocelluloses, et l'on peut en déduire, comme nous l'avons fait pour ces dernières substances, que la gélatine étudiée se compose d'une partie amorphe et d'une partie cristallisée. Il existe donc deux états coexistants de la gélatine, dont l'un correspond à un arrangement périodique, et l'autre à un arrangement statistiquement désordonné, présentant seulement une

valeur d'écartement intermoléculaire moyen. Comme nous le verrons plus loin, on peut rapporter le premier état à une phase fortement polymérisée, et le second état à une phase faiblement polymérisée; on retrouve là une conception analogue à celle que nous avons proposée pour les dérivés cellulotiques et que d'autres auteurs ont proposée également pour le caoutchouc, ce qui montre la grande généralité de cette structure de l'état colloïdal solide.

L'obtention de diagrammes présentant des renforcements (fig. 2, pl. I) est caractéristique d'une orientation provoquée sans doute par la contraction due au départ de l'eau et aux tensions internes qui en résultent. Si les molécules ou micelles de gélatine étaient sphériques, un tel phénomène ne



FIG. 1.

pourrait pas se produire; il faut pour cela qu'elles aient une forme allongée, et cette simple expérience nous amène déjà à concevoir des éléments structuraux très dissymétriques.

La partie cristallisée (anneaux fins) s'oriente mieux que la partie amorphe; ceci signifie probablement que cette dernière est formée d'éléments moins allongés, et de longueurs assez différentes les unes des autres; c'est ce qui amène à penser qu'il s'agit d'une phase moins polymérisée que celle qui constitue la partie cristalline.

La figure 1 indique comment l'on peut se représenter la disposition des axes des micelles dans la tranche et suivant la surface de la feuille de gélatine. Comme nous verrons plus loin, la partie cristalline de la gélatine est constituée par des chaînes allongées (chaînes de valence principale suivant Meyer et Mark), composées de restes d'acides aminés; ces chaînes ont tendance à se coucher à plat parallèlement au support du séchage, comme cela a lieu, à un degré moindre, pour les films d'acétate ou de nitrocellulose (J.-J. Trillat, *loc. cit.*).

b) ÉTUDE DE LA GÉLATINE ÉTIRÉE. — Un nouvel élément d'étude va nous être donné par l'examen de la même feuille de gélatine, fortement étirée suivant une direction à 200 p. 100. Dans ce cas, à l'inverse du cas précédent, on obtient un diagramme sans renforcements (isotropie), lorsqu'on examine la bande de gélatine suivant la direction de la traction (voir schéma 2 et fig. 4, pl. II). Au contraire, les diagrammes pris normalement à la surface de coulée et suivant la tranche, perpendiculairement à la direction de la traction, montrent une orientation très intense (schéma 2 et fig. 3, pl. II); le cliché est caractéristique de cette orientation. L'anneau de grand diamètre se scinde en deux secteurs suivant deux directions perpendiculaires; le halo amorphe présente aussi deux très forts renforcements



FIG. 2.

et prend un peu l'apparence d'une ellipse; enfin il apparaît quatre points d'interférence bien définis, symétriquement placés par rapport au centre.

Ce dernier diagramme, très net, indique un degré de symétrie supérieur à celui observé dans le cas précédent; il existe un axe d'orientation parallèle à la direction d'étirement, et la structure de la gélatine sous tension se rapproche de celle d'une structure cristalline bien orientée. Des diagrammes assez semblables sont fournis par les gels d'acétate ou nitrocellulose étirés. La présence de ces quatre points définissant deux « lignes de couches » (Schichtlinien) permet, suivant les relations de Polanyi, de calculer la période d'identité suivant l'axe de traction ou d'orientation. On trouve ainsi environ: $a = 9,5 \text{ \AA}$ ($1 \text{ \AA} = 10^{-8}$ centimètres). A l'équateur, l'écartement entre les plans réticulaires donnant lieu aux deux taches intenses de diffraction est de $d = 11,9 \text{ \AA}$. Il n'est pas possible, sans faire certaines hypothèses, d'établir avec ces éléments les trois dimensions de la cellule élémentaire, l'une de celles-ci devant cependant être

égale à $9,5 \text{ \AA}$; quoi qu'il en soit, la distance trouvée correspond probablement à la longueur d'un seul groupe $\text{C}^2\text{H}^2\text{NO}$, placé suivant l'arête de la cellule en admettant en première approximation une symétrie rhombique.

Ainsi, par étirage, la gélatine présente une structure analogue à celle d'autres substances connues comme possédant une disposition micellaire ordonnée. Le simple séchage sur un filet amène déjà une orientation des micelles parallèlement au support, et la traction régularise cette orientation suivant le sens de l'étirement. La disposition des micelles peut être représentée alors par le schéma de la figure 2.

De ce résultat, on peut tirer la conclusion que non seulement la partie cristalline de la gélatine s'oriente, mais aussi la partie amorphe, ce qui résulte d'un empilement suivant la direction de traction des molécules allongées et parallélisées. Sans qu'il apparaisse de structure à trois dimensions, cette phase amorphe s'oriente donc de la même façon que la partie cristalline.

Ces divers résultats permettent de se faire une idée plus complète de la constitution de la gélatine. Dans ce cas, comme dans celui de la cellulose, du caoutchouc ou de la soie naturelle, il se forme des chaînes moléculaires ou « chaînes de valence principale » (Meyer, *loc. cit.*), par accollement bout à bout de groupes élémentaires ayant une longueur de $9,5 \text{ \AA}$. Dans le cas de la cellulose, les chaînes sont, comme on sait, formées par des restes glucosidiques reliés par un atome d'oxygène, ces chaînes possédant une longueur variable suivant la nature de la cellulose étudiée. Dans la gélatine, il en est de même pour la partie cristalline, les chaînes étant constituées ici par des restes d'acides aminés; mais on sait que cette substance contient 15 ou 16 acides aminés différents, alors que la cellulose est seulement composée de la répétition du même élément $\text{C}^6\text{H}^{10}\text{O}_5$ et le caoutchouc par la répétition du même élément C^5H_8 ou isoprène. La théorie de Meyer sur les chaînes de valence principale est, d'autre part, la seule qui permette de rendre compte des particularités observées dans nos diagrammes. Il faut donc admettre, comme le pense aussi Hermann, que les divers éléments constitutifs des chaînes de la gélatine sont très voisins chimiquement; la formation de chaînes constituées

d'éléments divers, mais très voisins, explique ainsi la formation de chaînes des polypeptides. Comme pour les autres corps possédant cette propriété, les chaînes de valence principale sont unies latéralement par des forces de valence secondaire, ce qui explique l'apparition de cristallites, moins bien formés que de vrais cristaux, mais susceptibles tout de même de donner lieu à des diffractions cristallines. Ces chaînes constituent, à vrai dire, une phase fortement polymérisée, la polymérisation provenant précisément de l'accolement d'un grand nombre de groupes élémentaires qui se répètent suivant chaque chaîne. C'est en quelque sorte l'armature de la gélatine.

Quant à la partie amorphe, nous avons vu qu'elle n'était pas capable de donner lieu à un arrangement à trois dimensions; elle est vraisemblablement constituée par les mêmes substances que la partie « cristallisée », mais sous une forme physique différente, analogue à celle qui serait présentée par un liquide brusquement solidifié avec tous ses états de probabilité statistique. Nous pensons que cette partie renferme la plus grande quantité de l'eau contenue dans la gélatine, et qu'elle est incapable de donner lieu à la formation de longues chaînes (faible indice de polymérisation). Elle forme en quelque sorte le ciment entre les micelles, celles-ci pouvant se toucher par quelques points (attraction latérale des chaînes) en donnant une structure assez analogue à celle d'une éponge.

Cette structure à deux phases (amorphe et cristalline) paraît générale pour un très grand nombre de corps (caoutchouc, dérivés cellulosiques, etc.). Ces résultats présentent aussi un intérêt en biologie, car les collagènes sont très répandus dans la nature vivante, et un grand nombre de phénomènes dus par exemple à la contraction ou à l'étirement peuvent être rapprochés des résultats obtenus.

Enfin, il est important de noter que ces phénomènes d'orientation de la gélatine décelés aux rayons X s'accompagnent d'une augmentation considérable de la résistance mécanique dans le sens de la traction.

En effet, Bergmann et Jacobi (*Koll. Zeit.*, 49, septembre 1929, p. 46) ont montré que, pour une bande de gélatine étirée à 300 p. 100, la résistance à la rupture est de 9 kilogr. 300 par millimètre carré dans la direction de l'étirement et de

4 kilogr. 400 pour la gélatine non étirée; pour la première, la surface de rupture est dentelée, tandis que pour la deuxième elle est lisse. Nous avons antérieurement montré qu'il se passait la même chose pour les films d'acétate ou nitrocellulose étirés.

Les hypothèses que nous avons faites sur la structure de ces films ainsi que sur la structure de la gélatine, d'après les diagrammes X, expliquent bien ces faits expérimentaux. Il est

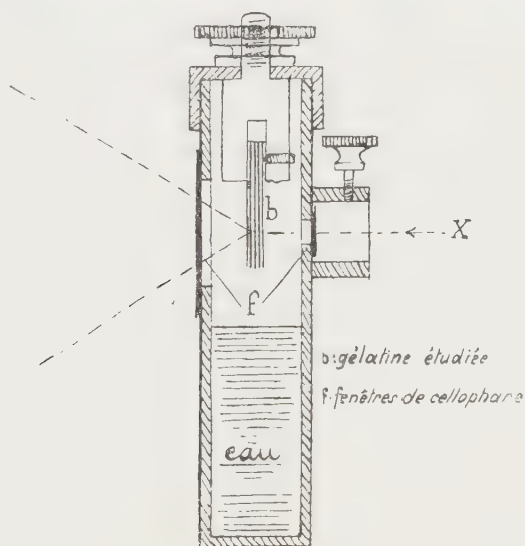


FIG. 3. — Appareil pour l'étude du gonflement de la gélatine par l'eau.

donc important de constater que lorsque des corps sont composés de très longues chaînes (chaînes de valence principale), celles-ci peuvent s'orienter parallèlement les unes aux autres sous diverses influences extérieures (traction, pression, séchage, etc.), et conférer alors à la substance des propriétés mécaniques nouvelles, ainsi que parfois de nouvelles propriétés physico-chimiques (teinture).

INFLUENCE DU pH .

Nous avons étudié une série de gélatine de pH compris entre 5,2 et 7,6. Contrairement à ce qu'avaient observé Clark et

Lanyon (1), nous n'avons pas trouvé de différences visibles entre ces produits.

II. — Etude du gonflement de la gélatine par l'eau.

Nous avons cherché à étudier les modifications des diagrammes X en fonction de la quantité d'eau contenue dans la gélatine. Dans ce but, on gonflait la gélatine précédemment étudiée pendant des temps variables dans de l'eau. La bande gonflée était placée dans un appareil spécialement construit pour cette étude (voir fig. 3); la durée des poses était suffisamment courte pour que, dans les conditions opératoires utilisées, le poids ne varie pas sensiblement; un contrôle était d'ailleurs effectué pour chaque essai en pesant la bande de gélatine avant et après la pose.

Les recherches ont porté sur des degrés de gonflement compris entre 0 (gélatine sèche) et 1,050 p. 100.

Les résultats obtenus présentent des particularités remarquables, que l'on peut résumer de la façon suivante :

Tandis que l'un des anneaux fins (d'origine cristalline) ne varie pas en position, mais seulement en intensité, quand la quantité d'eau augmente, pour disparaître à partir d'un degré de gonflement de 100 p. 100 environ, l'autre anneau, celui de petit diamètre, voit son rayon diminuer rapidement à mesure que la quantité d'eau croît.

Ceci correspond à une augmentation de la distance réticulaire, comme l'indique le tableau suivant, ainsi que la courbe de la figure 4.

DEGRÉ DE GONFLEMENT.

	SÈCHE	25 p. 100	50 p. 100	100 p. 100	200 p. 100
Diamètre de l'anneau.	13,9	11,8	11	10,2	9,2 Mm.
Distance réticulaire.	11,1	13,1	14	15,1	16,8 Ang.

Ainsi l'élargissement du réseau de la partie cristalline de la gélatine n'a lieu que suivant certaines directions et pas dans d'autres; la structure en chaînes de valences principales

(1) CLARK et LANYON. *Applied X-Rays*, 1927, p. 194.

explique d'ailleurs très bien ce phénomène. En effet, on sait que ces chaînes possèdent une grande solidité dans le sens de leur longueur, puisque les éléments constitutifs sont main-

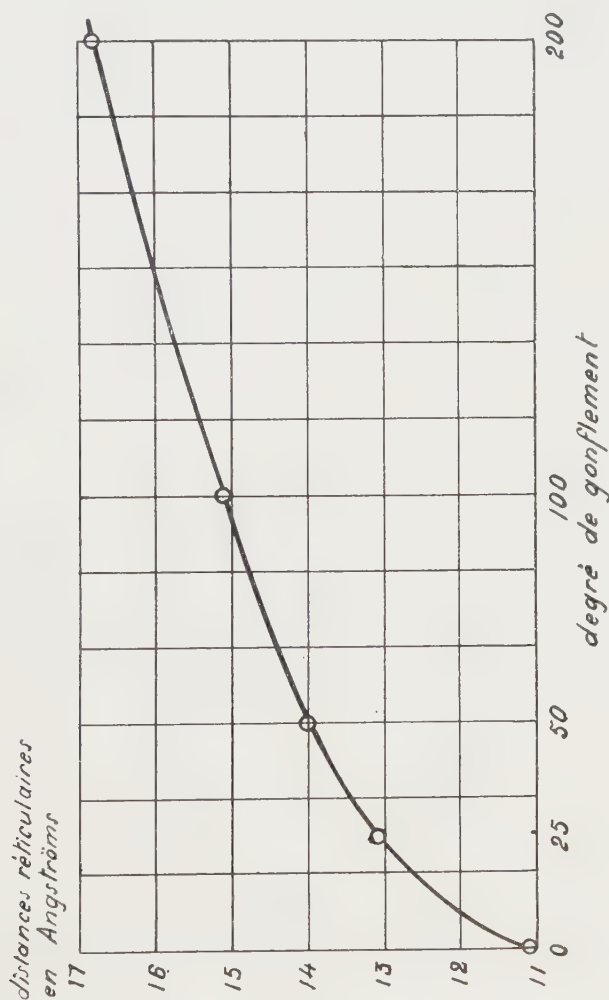


FIG. 4. — Changements de distance réticulaire en fonction du degré de gonflement de la gélatine par l'eau.

tenus en place par des forces intenses; au contraire, l'attraction qu'éprouvent latéralement ces chaînes les unes vis-à-vis des autres est plus faible (forces de valences secondaires). Par conséquent, l'eau ne peut que pénétrer entre les chaînes en les écartant, mais ne peut s'interposer entre les chaînes

d'une même chaîne; d'où l'accroissement observé de la distance réticulaire suivant certaines directions seulement.

L'anneau de petit diamètre qui est le seul à se contracter est donc dû à des plans réticulaires non perpendiculaires à la direction des chaînes de polypeptides, tandis que l'anneau de grand diamètre, dont la position ne varie pas, est dû à des plans perpendiculaires à ces chaînes.

Pour ce qui est du halo (partie amorphe), on constate que son diamètre augmente avec la quantité d'eau fixée; par conséquent, les espacements intermoléculaires correspondants diminuent. Pour un degré de gonflement suffisant, on n'obtient plus que le halo principal de l'eau ($d=3,2 \text{ \AA}$).

Il a été prouvé par Hermann (*loc. cit.*) que cette dilatation du halo n'était pas un simple effet mécanique de superposition des intensités du halo de la gélatine et du halo de l'eau. Il se produit un phénomène analogue à celui observé par Hertlein (1) pour les mélanges d'alcool et d'eau, phénomène attribuable à l'association des molécules d'eau avec les molécules d'alcool, cette association ne se produisant d'ailleurs qu'en certains points, notamment au voisinage des groupements alcooliques CH^2OH . Dans le cas de la gélatine, on peut admettre alors qu'il s'agit d'interférences entre les molécules d'eau et les molécules de gélatine. Ainsi la traduction röntgénographique de l'action de l'eau est tout à fait différente pour la partie amorphe et la partie cristalline.

Conclusion.

En résumé, on peut se faire du gonflement l'image suivante : la gélatine paraît constituée par une armature formée de faisceaux de chaînes de valences principales entremêlées (partie cristalline) et comprenant entre elles une partie amorphe de structure analogue à un liquide. La configuration d'une éponge nous paraît donner une assez bonne idée de celle de la gélatine. Lorsqu'on étire un tel système, les diverses « cloisons » tendent à s'orienter en donnant lieu aux diagrammes de fibres

(1) HERTLEIN. *Zeit. f. Phys.*, **54**, 1929, p. 341.

caractéristiques; les intervalles entre ces cloisons diminuent, et par suite de cet effet d'étirement la partie colloïdale amorphe s'oriente elle aussi légèrement, comme on l'a constaté.

Lorsque la gélatine est placée dans l'eau, elle se gonfle. L'eau pénètre entre les mailles du réseau en se mélangeant à la phase amorphe, et se glisse entre les chaînes dont l'assemblage forme la carcasse des cloisons. Il se produit alors un écartement de celles-ci très visible sur les diagrammes (dilatation suivant une direction); ce dernier effet s'observe dès l'adjonction de faibles quantités d'eau, car un écartement même faible de plans réticulaires se traduit de suite par une diminution du diamètre de l'anneau correspondant. A mesure que la quantité d'eau augmente, le système perd de plus en plus sa cohésion, par suite de la destruction progressive des forces secondaires qui maintiennent rassemblées les chaînes de valence principale formant l'armature.

Résumé.

1° On a étudié la gélatine à l'état de feuilles minces obtenues par séchage sur filet. L'examen par les rayons X montre que le seul fait du séchage amène déjà une très nette orientation des micelles parallèlement à la surface du support.

2° La même gélatine, étirée à 200 p. 100 suivant une direction, présente une orientation extrêmement intense dans le sens de la traction, coïncidant avec une amélioration de propriétés mécaniques suivant cette même direction.

3° Les diagrammes montrent que la gélatine est composée d'une partie fortement polymérisée, formée de chaînes de valences principales (restes d'acides aminés), et qui donne des diagrammes voisins de ceux obtenus avec des cristaux, et d'une partie amorphe, moins polymérisée, susceptible de s'orienter aussi légèrement par séchage ou traction.

4° On a calculé la période d'identité (ou l'une des dimensions de la cellule élémentaire suivant l'axe de fibre); elle est égale à 9,5 Å.

5° Ces résultats ressemblent beaucoup à ceux obtenus par nous sur les dérivés cellulosiques à l'état de films. On donne

d'après cela une théorie de la constitution de la gélatine, basée sur les renseignements obtenus par les rayons X.

6° Les diverses actions physiques (séchage, étirage, pression, etc.) exercent donc, sur tous les corps constitués par des chaînes très allongées, une action considérable d'orientation décelable aux rayons X. Cette action s'accompagne de grands changements dans les propriétés physiques et mécaniques de ces substances.

7° Le gonflement par l'eau a été aussi étudié. On trouve une modification importante de la partie cristalline, se traduisant par un écartement des plans réticulaires perpendiculairement à la direction des chaînes; l'eau pénètre donc entre les chaînes qu'elle écarte, mais ne peut se fixer à l'intérieur d'une de celles-ci. La partie amorphe subit également des modifications.

8° On peut, à la suite de ces recherches, émettre l'hypothèse que la gélatine a une structure analogue à celle d'une éponge, l'armature solide étant constituée par les faisceaux de chaînes de polypeptides accolés latéralement, les intervalles étant remplis par la partie amorphe. On explique ainsi de façon satisfaisante les effets d'orientation par étirement et le processus du gonflement par l'eau.

Le Gérant : G. MASSON.

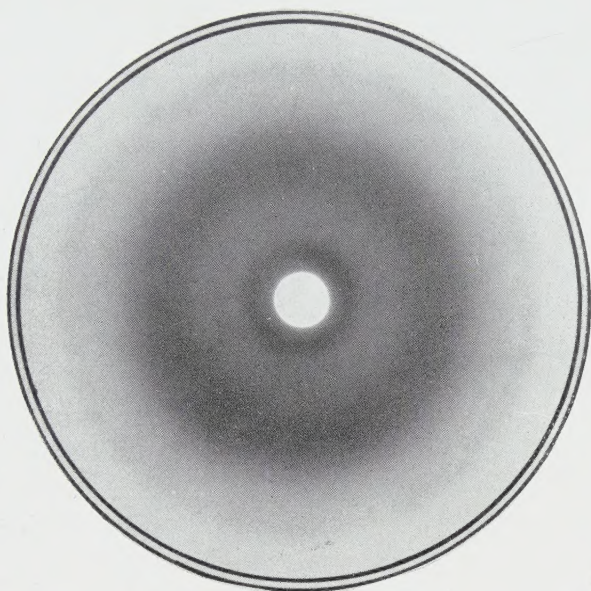


FIG. 1. — Gélatine séchée sur filet, non étirée.
Rayons X perpendiculaires à la surface de la feuille de gélatine.

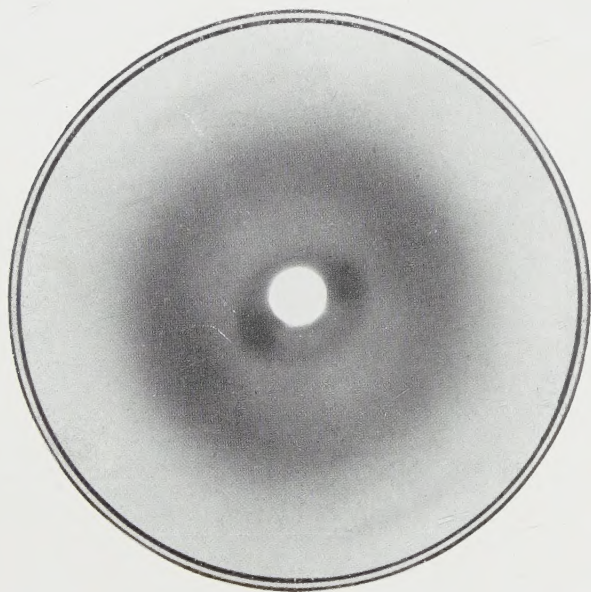


FIG. 2. — Gélatine séchée sur filet, non étirée.
Rayons X parallèles à la tranche de la feuille de gélatine.

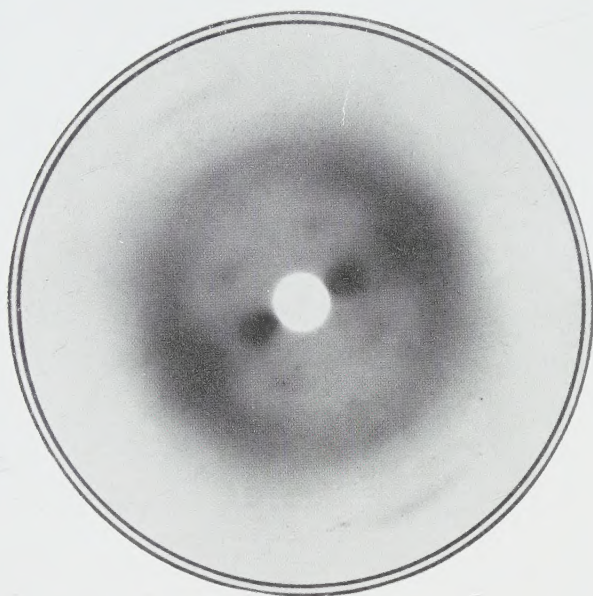


FIG. 3. — Gélatine étirée à 200 ‰.
Rayons X perpendiculaires à la direction de la traction.

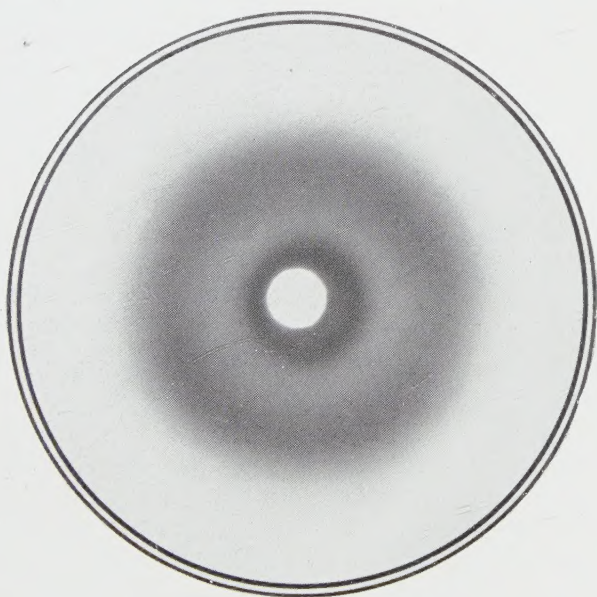


FIG. 4. — Gélatine étirée à 200 ‰.
Rayons X parallèles à la direction de la traction.

